ÜBER EIGENSCHAFTEN DER PHOSPHOFRUKTOKINASE AUS RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ingeborg Anke Brand
aus Deventer

Göttingen 1974

ÜBER EIGENSCHAFTEN DER PHOSPHOFRUKTOKINASE AUS RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ingeborg Anke Brand
aus Deventer

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof.Dr.W.Seubert

Korreferent: Prof.Dr.G.Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 14.2.1974

Diese Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof.Dr.Hans-Dieter SÖLING in der Zeit von 1969 bis 1973 in der Abteilung für Klinische Biochemie der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen durchgeführt. Herrn SÖLING danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Anregende Diskussionen mit ihm und die Ermunterung, Teilergebnisse auf Kongressen vorzutragen,nicht zuletzt das erfreuliche Arbeitsklima in seinem Labor, sorgten dafür, daß die Motivation zur Weiterarbeit stets erhalten blieb.
Ich danke IRMINGARD MARKUSCH, CHRISTIAN HEROLD und JAN PLOTZKI, die mir zeitweise bei mühseliger Kleinarbeit halfen.

Insbesondere bin ich Herrn Prof.Dr.Werner SEUBERT, Direktor des Physiologisch-Chemichen Instituts der Universität Göttingen, der freundlicherweise die Schirmherrschaft für diese Arbeit übernahm, zu Dank verpflichtet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0024

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Einleitung	1
1.	Kapitel I:	
	Die Isolierung des Enzyms aus Rattenleber ..	4
1.1.	Allgemeine Einführung	4
1.2.	Methoden zur Reindarstellung der PFK aus Rattenleber	5
1.2.1.	Methoden der Anreicherung	5
1.2.1.1.	Extraktion	5
1.2.1.2.	Erste Propanol-(2)-Fällung kombiniert mit Hitzefällung variiert nach LING et al.(1965).	6
1.2.1.3.	Zweite Propanol-(2)-Fällung	6
1.2.1.4.	DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie	7
1.2.1.5.	Ammoniumsulfatfällung (AS-F)	7
1.2.1.6.	Gelfiltration	7
1.2.1.7.	Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation	7
1.2.1.8.	Ammoniumsulfat-Extraktion	8
1.2.2.	Methoden der Reinheitsüberprüfung und Molekulargewichtsbestimmungen	8
1.2.2.0.	Vorbemerkungen	8
1.2.1.2.	7,5-prozentige PAA-Elektrophorese	9
1.2.2.2.	Natriumdodecysulfat - PAA-Elektrophores	9
1.2.2.3.	Linearer PAA-Gelgradient	10
1.2.2.4.	Durchführung der Elektrophorese	11
1.2.2.5.	Anfärbung und Entfärbung der Gele	11
1.3.	Ergebnisse I: Isolierung,Reinheitsnachweise und Molekulargewichtsbestimmungen	13
1.3.1.	Ergebnisse der Enzymisolierung	13
1.3.2.	Ergebnisse der Reinheitsnachweise	17
1.3.3.	Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen	18
1.3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Isolierung, Reinheitsnachweise und Molekulargewichtsbestimmungen	22
1.4.	Diskussion	23

2.	Kapitel II:	
	Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus	27
2.1.	Allgemeine Einführung	27
2.2.	Kinetische Methoden	28
2.2.1.	Steady-State-Kinetik der Hin- und Rückreaktion der PFK	28
2.2.1.1.	Die Hinreaktion	29
2.2.1.2.	Die Rückreaktion	30
2.2.1.2.1.	Testansätze der Rückreaktionen	30
2.2.1.2.2.	Zur Bestimmung des Mechanismus der Rückreaktion	31
2.2.2.	Hemmkinetiken	32
2.2.2.1.	Vorbemerkung	32
2.2.2.2.	Testansätze der Produkthemmkinetiken	33
2.3.	Ergebnisse II	37
2.3.1.	Ergebnise der Steady-State-Kinetik der Hin- und Rückreaktion der PFK.....	37
2.3.1.1.	Ergebnisse der Steady-State-Kinetik der Hinreaktion der PFK	37
2.3.1.2.	Ergebnisse der Rückreaktionskinetiken	40
2.3.1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Steady-State-Kinetiken der Hin- und Rückreaktion	44
2.3.2.	Ergebnisse der Produkthemmkinetiken	45
2.3.2.1.	ADP-Hemmtyp gegenüber ATP bei nicht sättigendem,konstantem zweiten Substrat ...	45
2.3.2.2.	ADP-Hemmtyp gegenüber ATP bei sättigender konstanter Konzentration des zweiten Substrates	46
2.3.2.3.	FDP-Hemmtyp gegenüber ATP bei nicht sättigender konstanter Konzentration des zweiten Substrates	46
2.3.2.4.	FDP-Hemmtyp gegenüber ATP bei sättigender konstanter Konzentration des zweiten Substrates	47
2.3.2.5.	FDP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei nicht sättigender konstanter Konzentration an ATP	48
2.3.2.6.	FDP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei sättigender Konzentration an ATP	48
2.3.2.7.	ADP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei nicht sättigender konstanter Konzentration von ATP	49
2.3.2.8.	ADP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei sättigender konstanter ATP-Konzentration	50

2.3.2.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten Hemmkinetiken	50
2.4.	Diskussion	53
2.4.1.	Diskussion der Ergebnisse der Steady-State-Kinetiken der Hin- und Rückreaktion	53
2.4.2.	Diskussion der Ergebnisse der Produkt-Hemmkinetiken	54
3.	Kapitel III: Untersuchungen über die Wirkung von Effektoren, die einen aktivierenden oder inaktivierenden Einfluß auf die Phosphofruktokinase-Reaktion haben	57
3.1.	Allgemeine Einführung	57
3.2.	Methoden und Ergebnisse	59
3.2.1.	Allgemeine Testbedingungen	59
3.2.2.	ATP-Hemmung	59
3.2.3.	Hemmung durch ADP	61
3.2.4.	Citrathemmung	64
3.3.	Ansätze zur Bestimmung regulatorischer Bindungsstellen	66
3.3.1.	Fragestellung	66
3.3.2.	Methoden	67
3.3.2.1.	Allgemeine Testbedingungen	67
3.3.2.2.	Spezielle Testbedingungen	67
3.3.3.	Ergebnisse III.....	69
3.3.3.1.	Katalytische PFK-Aktivität des PFK-Antikörperkomplexes	69
3.3.3.2.	ATP-Kinetik mit dem PFK-Antikörperkomplex .	69
3.3.3.3.	Die Hemmbarkeit der enzymatischen Reaktion durch ADP	70
3.3.3.4.	Wirkung von ATP,AMP,F-6-P und Citrat auf die PFK-Antikörperkomplexbildung	71
3.4.	Diskussion	73
3.4.1.	Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der allosterischen Eigenschaften durch Effektoren	73
3.4.2.	Diskussion der Versuchsergebnisse zur Bestimmung regulatorischer Bindungsstellen an der PFK	75

4.	Kapitel IV: Untersuchungen zur Frage der Interkonvertierbarkeit von Phosphofruktokinase aus Leber ..	76
4.1.	Fragestellung	76
4.2.	Methoden	77
4.2.1.	Versuche zur Klärung des Einflusses von F^-, Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF) und cyclischem AMP auf die PFK-Aktivität	77
4.2.2.	Versuche zur Klärung der Abhängigkeit der Aktivierbarkeit der PFK durch Fluorid von verschiedenen Faktoren	77
4.2.2.1.	Abhängigkeit der Fluoridaktivierung von Phosphat	77
4.2.2.2.	pH-Abhängigkeit der F^--Aktivierung	78
4.2.2.3.	Abhängigkeit der Aktivierung durch Fluorid von dem Ernährungszustand der Versuchstiere	78
4.2.2.4.	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aktivierung durch Fluorid von niedermolekularen Faktoren	78
4.2.3.	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aktivierung durch Fluorid von Proteinfaktoren ..	79
4.3.	Ergebnisse IV	80
4.3.1.	Einfluß von F^-, PMSF und cycl.AMP auf die PFK-Aktivität	80
4.3.2.	Abhängigkeit der Aktivierung der PFK durch F^- von verschiedenen Faktoren	80
4.3.2.1.	Abhängigkeit der Aktivierung der PFK durch F^- von Phosphat	80
4.3.2.2.	pH-Abhängigkeit der PFK-Aktivierung durch Fluorid	81
4.3.2.3.	Auswirkung des Ernährungszustandes der Versuchstiere auf die PFK-Aktivierbarkeit durch Fluorid	82
4.3.2.4.	Abhängigkeit der PFK-Aktivierung durch Fluorid von niedermolekularen Faktoren	83
4.3.2.5.	Abhängigkeit der PFK-Aktivierung durch Fluorid von Proteinfaktoren	86

4.4. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über eine proteinabhängige Aktivierung der PFK 88

4.5. Disskussion der Ergebnisse 88

Gesamtzusammenfassung 90

Anhang 91

Literaturverzeichnis 98

Einleitung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, das Enzym Phosphofruktokinase, ATP: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, EC 2.7.1.11, (PFK), der Rattenleber auf seine Eigenschaften hin zu untersuchen.

Über das aus der Leber gewonnene Enzym PFK sind bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht worden, die über seine kinetischen Eigenschaften und über die Regulation seiner Aktivität berichten (RAMAIAH et al., 1970; KEMP, 1971). Eine systematische Untersuchung mit dem reinen Enzym aus Leber liegt bisher nicht vor. Dagegen ist sehr viel gearbeitet worden über PFK aus anderen Ausgangsmaterialien, z.B. aus Kaninchenmuskel (PAETKAU et al., 1967), aus Schafherzmuskel (LORENSON et al., 1969), aus Gehirn (LOWRY et al, 1966), Hefe (KOPPERSCHLÄGER et al., 1972) und E.coli (BLANGY et al., 1968). Von der PFK ist bekannt, daß sie ein allosterisches Enzym ist und einen Schritt katalysiert, der für die Gesamtglykolyse regulatorisch wirksam ist, daß sie ferner eine Hemmbarkeit durch ATP aufweist (LARDY und PARKS,1956), welches ein Substrat des Enzyms, aber auch ein Endprodukt der Glykolyse ist.

Die Hemmung durch ATP ist von einer Vielzahl von Effektoren abhängig. So wirken AMP und F-6-P in genügend hohen Konzentrationen dieser Hemmung bis zur Aufhebung entgegen (RAMAIAH et al., 1964; LAYZER et al., 1969, u.a.), während Citrat die Hemmung verstärkt (POGSON und RANDLE, 1966).

Auffällig ist die starke pH-Abhängigkeit der allosterischen Eigenschaften in dem pH-Bereich von 7,0 bis 7,6. Am Neutralpunkt sind evtl. Schwankungen des pH-Wertes um 0,2 schon ausreichend, um Veränderungen der kinetischen Eigenschaften hervorzurufen (TRIVEDI and DANFORTH,1966). Uns interessiert speziell das Leberenzym, da im Lebergewebe im Gegensatz zum Muskelgewebe Glukose-6-Phosphatase-Aktivität und Glukoseneubildung zu finden sind. Dieses läßt eine starke Regulation der Phosphofruktokinaseaktivität vermuten, durch die ein ATP-verlustreicher Substratzyklus, der durch das Enzympaar PFK-Fruktose-1,6-Diphosphatase katalysiert würde, verhinderbar wäre. CLARK et al.

(1973) konnten diesen Substratzyklus im Muskel des Schmetterlings nachweisen und zeigen, daß er bei niedrigen Temperaturen der Umgebung der Versuchstiere die für das Fliegen notwendige Wärmeenergie erzeugt.
Anzunehmen ist, daß auch eine Umschaltung von Glykoneogenese auf Glykolyse ohne Regulation der PFK nicht möglich ist. Dafür spricht die Untersuchung von GARRISON und HAYNES (1973), die nachwiesen, daß Glukagon die Gluconeogenese aus Fruktose und Dihydroxyaceton in isolierten Rattenleberzellen stimuliert. Die Aktivität von Fruktose-1,6-Diphosphatase wird gesteigert, die der Pyruvatkinase und Phosphofruktokinase vermindert. Da die Regulation der PFK fast ausschließlich am Muskelenzym untersucht worden ist, erscheint uns die Bearbeitung der Eigenschaften des Leberenzyms wichtig. Die im Gegensatz zum Muskelgewebe hundertfach geringere PFK-Aktivität und die größere Labilität des Enzyms müssen dabei in Kauf genommen werden.

Die Entscheidung, über oben genannte Problembereiche zu arbeiten, ist zusätzlich motiviert worden dadurch, daß die Arbeitsgruppe, der ich mich anschloß, schon des längeren mit dem gluconeogenetischen Gegenenzym, der Fruktosediphosphatase aus der Rattenleber, arbeitet und spezielle Untersuchungen zur PFK möglicherweise wichtige Teilergebnisse innerhalb eines umfassenderen Forschungsprogramms erbringen könnten.

Die vorliegende Untersuchung konzentriert sich auf vier Schwerpunkte,

1. die Isolierung des reinen Enzyms,
2. die Bestimmung des Reaktionsmechanismus,
3. die Bestimmung einiger allosterischer Eigenschaften und
4. die Untersuchung einer eventuellen proteinabhängigen Aktivitätsregulation.

Ad 1: Die Isolierung des reinen Enzyms ist notwendige Voraussetzung zur näheren Charakterisierung sowohl der kinetischen als auch der regulatorischen Eigenschaften, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß durch die Reinigung Veränderungen am Protein erfolgen, die nicht zuletzt sich auch auf seine Eigenschaften auswirken.

Ad 2: Zur Bestimmung des Reaktionsmechanismus liegen in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vor (hierauf wird unter 2.1. detaillierter eingegangen). Die Klärung des Reaktionsmechanismus wäre ein Beitrag zur Erhellung des enzymatischen Phosphorgruppentransfers, ferner zur Bestimmung wichtiger kinetischer Konstanten, wodurch eine Gewichtung physiologischer Substratschwankungen auf die Enzymaktivität ermöglicht würde.

Ad 3: Die Überprüfung einiger allosterischer Eigenschaften erfolgt im Hinblick auf den speziellen Leberstoffwechsel.

Ad 4: Die Untersuchung einer möglichen proteinabhängigen PFK-Regulation basiert auf unterschiedlichen Befunden hinsichtlich der Interkonvertierung der ATP-hemmbaren in eine nicht-hemmbare Form der PFK. Während VINUELA et al. (1964) - mit dem Ausgangsmaterial Hefe arbeitend - Anhaltspunkte für eine proteinabhängige Interkonvertierung der ATP-hemmbaren in eine nicht-hemmbare Form erhalten zu haben glaubten, konnte die Arbeitsgruppe um HOLZER (AFTING et al., 1971) diesen Effekt auch ohne Beteiligung einer Proteinfraktion nachweisen.

Bei unseren Untersuchungen am Leberhomogenat haben wir unter bestimmten Bedingungen eine Aktivierung der PFK gefunden, die nicht auf einer Interkonvertierung zu einer nicht ATP-hemmbaren Form,sondern auf einer Zunahme der spezifischen Aktivität beruht. Dies ist für uns der Anlaß gewesen, in der Leber nach PFK-aktivierenden Proteinfaktoren zu forschen.

1. Kapitel I:
Die Isolierung des Enzyms PFK aus Rattenleber

1.1. Allgemeine Einführung

Grundlegend für die Untersuchung von Eigenschaften der Phosphofructokinase aus Rattenleber ist zunächst die Isolierung durch Abtrennung möglichst sämtlicher Fremdproteine.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keine Veröffentlichungen über Reinigungsverfahren der PFK speziell aus Rattenleber vor; es konnte aber auf Erfahrungen zurückgegriffen werden, die bei der Isolierung des Enzyms aus anderen Ausgangsmaterialien gewonnen worden waren.

Der von LING et al.(1965) berichtete Befund, daß Fluorid eine Erhöhung der Ausgangsaktivität an PFK im Kaninchenmuskelextrakt bewirkt, war für uns ein wichtiger Hinweis.
Die ersten Reinigungen bis zur Kristallisation des Enzyms gelangen PARMEGGIANI et al (1966) und MANSOUR et al. (1966) aus Kaninchenmuskel- bzw. Schafherzmuskelgewebe. Sie erreichten spezifische Aktivitäten um 160 U/mg Protein. Bei ihren Arbeiten berücksichtigten sie, daß während des Isolierungsprozesses Adeninnucleotide und Hexosephosphate als aktivitätsstabilisierende Faktoren fungieren.

Bei den Reinheitsnachweisen mit Hilfe des Sedimentationsverhaltens des Enzyms fanden LING et al.(1965) und auch MANSOUR et al.(1966), daß das Enzym nicht als einheitlicher symmetrischer Peak im Schlieren-Pattern auftaucht. Erst nach Behandlung mit 2 M Harnstoff sedimentierte das Protein als symmetrischer Einzelpeak, und zwar mit einer Sedimentationskonstanten, die kleiner war als bei dem unbehandelten Protein. Hiermit waren erste Hinweise auf ein Aggregationsverhalten des Enzyms gegeben. Diese Befunde liefern wertvolle Erklärungsmöglichkeiten für Beobachtungen, die wir während der Präparation des Leberenzyms beobachten können.

Im Unterschied zum Enzym aus Muskelgewebe scheint die PFK der Hefe nur unter ganz bestimmten Bedingungen zu aggregieren (zum Beispiel niedriger pH-Wert). NISSLER et al. (1972) beobachte-

ten an ihrem Präparat einen einheitlichen symmetrischen Sedimentationspeak im Schlieren-Pattern. Mit Hilfe der Polyacrylamid-(PAA)-Gelelektrophorese konnten sie die Reinheit des Enzyms bestätigen.

Im Jahre 1971 veröffentlichte KEMP eine Methode zur Isolierung des Enzyms aus Rattenleber, die allerdings noch nicht zur Darstellung eines homogenen Präparates führte; er erreichte spezifische Aktivitäten, die zwischen 38 und 52 U/mg Protein lagen. Es gab für uns aber keinen Anlaß, die von uns inzwischen entwickelte Methode abzuändern, da der von uns erreichte Reinheitsgrad deutlich höher lag (s.Tab.1, S.16) als beim o.g.Autor.

Ein beachtenswertes Verfahren veröffentlichten MASSEY und DEAL (1973): Sie verwendeten sehr einfache und ökonomische Fällungs- und Extraktionsverfahren, die zu guten spezifischen Aktivitäten des Enzyms führten. Ein Versuch, diese Methode zu reproduzieren, ist uns allerdings mit dem Rattenleberenzym bisher nicht gelungen. Als Erklärungsgrund hierfür könnte der Speziesunterschied der Versuchstiere angeführt werden; denn MASSEY et al. arbeiteten am Leber- und Nierenenzym vom Schwein.

Auf Grund der im Vergleich zum Muskelenzym größeren Labilität des Leberenzyms (besondere Empfindlichkeit bei der Behandlung mit Hitze, Aceton und Säure) haben sich die seinerzeit bekannten Reinigungsverfahren nur begrenzt für unser Vorhaben anwenden lassen. Bei der Präparation des Enzyms aus Rattenleber ist der stabilisierende Effekt von NaF und F-6-P berücksichtigt worden. Außerdem konnte die von LING et al. (1965) entwickelte Propanol-(2)-Fällung in abgewandelter Form übernommen werden. Weitere Isolierungsschritte zur Reindarstellung des Enzyms aus Rattenleber waren zu entwickeln.

1.2. Methoden zur Reindarstellung der PFK aus Rattenleber

1.2.1. Methoden der Anreicherung

Im folgenden werden die einzelnen Isolierungsschritte dargestel-

1.2.1.1. Extraktion

Für die Enzymreinigung verwenden wir Material, das unter folgenden Bedingungen gesammelt und aufbewahrt wird:

Die den dekapitierten Ratten entnommenen Lebern werden in flüssiger Luft tiefgefroren und bis zur Verwendung bei-70° aufbewahrt. Die innerhalb von 10 Stunden bei +4° C aufgetauten Lebern werden im Braun-Mixer (Stufe 2) mit 0,1 M K-PO_4-Puffer/pH 7,6, 10 mM an NaF, 3 mM an $MgSO_4$, 5 mM an Mercaptoäthanol und 1 mM an Fructose-6-Phosphat (1:3,g/v) in 150 g Portionen bei 4° C 2 mal 20 Sekunden - mit 20 Sekunden Pause - homogenisiert. Das Homogenat wird anschließend bei 4° C und 3000 x g zentrifugiert. Nach 10 Minuten erhöht man die Beschleunigung für weitere 30 Minuten auf 17 000 x g. Um das flotierende Fett zu entfernen, gießt man den Überstand durch einen mit Glaswolle gefüllten Trichter. Der Niederschlag wird verworfen.

1.2.1.2. Erste Propanol-(2)-Fällung kombiniert mit Hitzefällung variiert nach LING et al. (1965)

Der Überstand wird mit 1 N NaOH auf pH 7,6 eingestellt, mit Fruktose-6-Phosphat (F-6P) (Endkonzentration 1 mM) versetzt und unterRühren im Wasserbad von 55° C auf 45° C erwärmt.
0,11 Vol. Propanol-(2) werden unter weiterem Rühren zugegeben. Nach 15 Minuten , vom Zeitpunkt der Zugabe an, bei dem die Temperatur des Homogenats bis auf 50° C ansteigen darf, wird auf +20° C abgekühlt und anschließend 30 Minuten lang bei +20° C und 17 000 x g zentrifugiert.

1.2.1.3. Zweite Propanol-(2)-Fällung

Man kühlt den Überstand der ersten Propanol-(2)-Fällung unter Rühren im Kryostaten auf -4° C und versetzt ihn mit weiteren 0,14 Vol. auf -4°C vorgekühltem Propanol-(2). Diese Mischung wird auf -6° bis -8° C heruntergekühlt und 30 Minuten lang gerührt. Dann zentrifugiert man 30 Minuten lang bei -8° C den Niederschlag bei 17 000 x g ab.

Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag in dem Puffer gelöst, der für den Rest der Aufarbeitung benutzt wird:

20 mM K-PO_4-Puffer/pH 7,6, der 3 mM an $MgSO_4$, 5 mM an Mercaptoäthanol und 1 mM an F-6-P ist.

Alle Arbeitsschritte werden bis zum Schluß bei einer Temperatur von etwa 4° C durchgeführt.

1.2.1.4. DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie

Diäthylaminoäthyl-Cellulose (DE - 52_r Whatmann) - äquilibriert in obigem Puffer - wird unter Druck in eine Säule gefüllt (ca. 1 ml abgesetzter Austauscher pro 15 mg Protein) und die Protein-Lösung aufgetragen. Die Säule wird mit Puffer so lange gespült, bis das Eluat nur noch eine Absorption bei 280 nm von 0,2 oder weniger aufweist. Dann wird ein linearer Gradient angestellt: Die Mischkammer eines Gradientengefäßes enthält den 20 mM K-PO_4-Puffer/pH 7,6 (s.1.2.1.3), die Zulaufkammer dagegen ein gleiches Volumen an 0,2 M K-PO_4-Puffer/pH 7,4 3 mM an $MgSO_4$, 5 mM an Mercaptoäthanol und 1 mM an F-6-P. Das Gesamtvolumen der Gradientenlösungen beträgt das Fünffache des Säulenvolumens. Das Eluat wird in 5 ml fraktioniert.

1.2.1.5. Ammoniumsulfat-Fällung (AS-F)

Die aktiven, d.h. die PFK-Aktivität enthaltenden Fraktionen des Eluats der DEAE-Cellulose-Säule werden innerhalb von 60 Minuten mit festem Ammoniumsulfat auf 26% Sättigung gebracht. Nach 30 Min. Rühren wird der Niederschlag abzentrifugiert (15 Min. 17 000 x g) und verworfen. Der Überstand wird auf 55% Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht, 60 Min. lang gerührt, zentrifugiert (30 Min. 17 000 x g) und der Niederschlag in möglichst kleinem Volumen mit dem unter 1.2.1.3. beschriebenen Puffer aufgenommen.

1.2.1.6. Gelfiltration

Eine Sepharose 4B-Säule (PHARMACIA) (4 x 100 cm), äquilibriert mit dem unter 1.2.1.3. genannten Puffer, wird mit der auf 5 - 10 ml eingeengten Proteinlösung beladen und mit dem gleichen Puffer eluiert und in 3 ml Fraktionen gesammelt. Die aktiven Fraktionen werden mittels eines AMICON-Druckfiltrationsgerätes eingeengt (Filter: Diaflo UM 10, AMICON).

1.2.1.7. Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

In Zentrifugenbechern, die zum Ausschwenkrotor Typ SW 25.1 (BECKMAN) passen, wird ein Sucrosegradient gegossen.
Jeweils 4 ml einer 55-,50-,45-,40-,35-,30- und 20%igen Sucroselösung (g/v) in K-PO_4 Puffer (s.1.2.1.3.) pipettiert man vorsichtig in die Zentrifugenbecher. Sämtliche Lösungen und Geräte sind auf +4°

temperiert. Die eingeengte Proteinlösung (jeweils 3ml pro Gradient) wird auf den Scrosegradienten aufgetragen und mit 21 000 U.p.m. - das entspricht 28 000 x g am oberen Rand bzw. 65 000 x g am Boden des Zentrifugenbechers - 24 Stunden lang bei 4° C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationslauf wird der Boden des Zentrifugenbechers mit einer Nadel durchstochen und der auslaufende Gradient in Fraktionen von 2 ml aufgefangen.

1.2.1.8. Ammoniumsulfat-Extraktion

Die 40- und 35-prozentigen Sucrosefraktionen werden vereinigt, gegen den unter 1.2.1.3. genannten Puffer dialysiert und mit festem Ammoniumsulfat auf 55% Sättigung gebracht. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und dann mit absteigenden Ammoniumsulfat-Konzentration extrahiert (50,45,40,35, 2 x 30 % Sättigung). Die aktiven Fraktionen werden mittels der unten genannten Kriterien auf die Reinheit der PFK überprüft. Aufbewahrt werden die Fraktionen im Kühlschrank bei ca. + 4° C. Das Einfrieren unseres Enzyms in dem unter 1.2.1.3. genannten Puffer ist stets mit großen Aktivitätsverlusten verbunden, auch das Lyophilisieren verringert den Verlust nicht.

1.2.2. Methoden der Reinheitsüberprüfung und Molekulargewichtsbestimmungen

1.2.2.0. Vorbemerkungen

Als eine der besten Methoden zur Überprüfung der Reinheit eines Enzyms gilt z.Zt. die Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch sie werden Proteine sowohl nach ihrer Molekulargröße als auch nach ihrer Nettoladung aufgetrennt. Die Schwierigkeiten, die durch das Aggregations-Dissoziationsverhalten des Enzyms in unserem Falle aufgetreten sind, konnten bei der Polyacrylamidgelelektrophorese überwunden werden, während dieses bei Sedimentationsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge bisher noch nicht gelungen ist. Deshalb wird von uns zur Reinheitsüberprüfung lediglich die Polyacrylamidgelelektrophorese herangezogen. Bei dieser Methode bietet sich an, zugleich Molekulargewichtsbestimmungen sowohl des Gesamtenzyms als auch der einzelnen Polypeptidketten durch-

zuführen.
Es werden dreierlei PAA-Elektrophoresen durchgeführt:
(1.) 7,5%-ige PAA-Elektrophorese ohne Sammelgel,
(2.) eine 5-prozentige Natriumdodecylsulfat-PAA-Elektrophorese,
(3.) eine Gelelektrophorese mit einem PAA-Gradienten.

1.2.2.1. 7,5-prozentige PAA-Elektrophorese

Das von MAURER (1968) als"Nr.I"(s.Anhang Methoden) veröffentlichte Gelsystem, welches 7,5% Acrylamid enthält, muß für unsere Zwecke variiert werden, da das zu untersuchende Protein zwischen Sammel- und Trenngel liegen bleibt. Auch ohne Sammelgel weist obiges System diesen Nachteil auf. Offensichtlich aggregiert das Enzym bei dem Konzentrierungsvorgang.
Auch bei einem 3,75%igem Gel (System MAURER "Nr.IV", s.Anhang Methoden) ist das Aggregat größer als die Porenweite. Erst der Zusatz von ATP sowohl im Gel als auch im Elektrodenpuffer sowie der Zusatz von Mercaptoäthanol zum Elektrodenpuffer ermöglicht eine erfolgreiche Durchführung der Elektrophorese.
Das Gel-System "Nr.I" von MAURER (1968, S.42/43) variieren wir wie folgt: Dem Trenngel wird 0,2 mM ATP zugesetzt; der Tris-Glycin-Elektrodenpuffer wird mit 0,1 mM ATP und 5 mM Mercaptoäthanol versetzt. Die Durchführung der Elektrophorese einschließlich der Färbung und Entfärbung der Gele ist weiter unten (vgl. 1.2.2.4. und 1.2.2.5.) dargestellt.

1.2.2.2. Natriumdodecylsulfat-PAA-Elektrophorese

SHAPIRO et al. (1967) wiesen nach, daß bei Anwesenheit des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, aus dem Englischen übernommene Abkürzung) die Trennung von Proteinen in der PAA-Elektrophorese nur nach der Molekulargröße ihrer Polypeptidketten erfolgt.
Wir benutzen diese Methode für unsere Untersuchungen, um die Grösse der Protomeren zu bestimmen. Das Verfahren gibt ferner Aufschl darüber, ob die Untereinheiten identische Molekulargrößen aufwe- sen. Falls Identität vorliegt, kann dies gleichzeitig als ein Re heitskriterium herangezogen werden.
Die SDS-PAA-Gelelektrophorese wird in Anlehnung an STEGEMANN (1972) durchgeführt:

Puffer: 0,025 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,1, 0,1% Mercaptoäthanol, 0,1% SDS;

Monomer: 7,5 g Acrylamid,
0,2 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid und 150 ml Puffer (s. oben);

Gel: 140 ml der filtrierten Monomerlösung werden versetzt mit 50 mg Natriumsulfit (wasserfrei),
0,35 ml Dimethylaminopropionitril (DMAPN),
2,8 ml Ammoniumpersulfat, 2%ig in H_2O.

Vorbehandlung der Proteinlösungen: Die PFK und Vergleichsproteine werden 14 Stunden bei 37°C in 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,1, der 0,1% Mercaptoäthanol und 1% SDS enthält, inkubiert. Das Inkubat enthält etwa 1 mg Protein/ml.

1.2.2.3. Linearer PAA-Gelgradient

Die Anwendung der PAA-Gelgradientenelektrophorese soll aufklären, aus wieviel Protomeren, deren Molekulargewicht mit der SDS-Gelelektrophorese bestimmt werden kann, das Enzym in seiner katalytisch aktiven Form besteht.

Der Acrylamid-Konzentrationsgradient wird mit einem Gradientmischer hergestellt, wobei die Versuchsbedingungen von KOPPERSCHLÄGER et al. (1969) folgendermaßen verändert werden:

Statt Zugabe eines $K_3(Fe(CN)_6$-Gradienten, der eine Verzögerung der Polymerisation bewirkt, benutze ich einen von oben nach unten abnehmenden Gradienten des Polymerisationskatalysators Dimethylaminopropionitril, wodurch ebenfalls eine Polymerisation von oben nach unten bewirkt wird . Hierdurch verhindert man die Zerstörung des Acrylamidgradienten durch Wärmekonvektion.

Lösung I: Tris/HCl-Puffer 0,35 M, pH 8,9; Acrylamid 15%; Bisacrylamid 0,75%; Persulfat 0,026 %; Dimethylaminopropionitril 0,294% (v/V); 0,1 mM ATP.

Lösung II: Tris/HCl 0,35 M, pH 8,9; Acrylamid 3%; Bisacrylamid 0,015%; Persulfat 0,015%; Diaminopropionitril 1%; 0,1 mM ATP.

Elektrodenpuffer: Tris 4 mM; Glycin 38 mM, pH 8,3; 0,1 mM ATP; 5 mM Mercaptoäthanol.

1.2.2.4. Durchführung der Elektrophorese

Die unter 1.2.2.1. und 1.2.2.2. beschriebenen Gemische werden durch Aufsaugen mit einer Kunststoffspritze entgast und sofort in Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 0,5 cm eingefüllt. Das Gemisch wird vorsichtig mit 0,2 ml H_2O überschichtet. Nach 30 Min. wird das Wasser entfernt. Die Oberfläche der Gele einige Male mit Elektrodenpuffer gespült und mit Protein-Lösung gefüttert. Die Proteinmenge setzt sich zusammen aus der gewünschten Menge Protein, ca. 1 µl Bromphenolblau-Lösung (0,1%ige wäßrige Lösung mit etwas NaOH alkalisch gemacht), einige Körnchen Sucrose und Elektrodenpuffer bis zu einem Endvolumen von 50 µl. Die Röhrchen werden mit Elektrodenpuffer aufgefüllt, so daß ein basenfreier Übergang von der oberen zur unteren Elektrodenkammer gewährleistet ist.

Die Elektrophorese wird mit konstanter Stromstärke von 4 mA/Gel durchgeführt, wobei die Anode an das untere, die Katode an das obere Pufferreservoir anzuschließen ist. Der Lauf wird beendet, wenn die Bromphenolblaubande bis kurz vor das untere Gelende gewandert ist.

Im Unterschied hierzu wird die Gelgradientenelektrophorese erst nach einer Zeitspanne beendet, die doppelt so lang ist wie die, welche das Bromphelblau bis zum Ende des Durchlaufs benötigt.

1.2.2.5. Anfärbung und Entfärbung der Gele

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele aus den Glasröhrchen herausgedrückt. Anschließend fixiert man die darin enthaltenen Proteine durch eine halbstündige Inkubation in 12,5-prozentiger Trichloressigsäure . Während die normalen Gele eine Stunde lang in der Farblösung bleiben, läßt man die SDS-Gele drei Stunden inkubieren.

Als Entfärber wird entweder eine Mischung aus Methanol/H_2O/Eisessig (12 : 28 : 2) (vgl. STEGEMANN, 1972) oder eine 10-prozentige Trichloressigsäure benutzt.

Spezifischer Farbnachweis für die PFK-Aktivität: Um den Nachweis zu erbringen, daß die unspezifisch angefärbte Proteinbande tatsächlich mit der PFK identisch ist, wird ein spezifischer PFK-Aktivitätstest in dem Gel durchgeführt. Dabei bediene ich mich des von GRAYMORE (1965) beschriebenen Redox-Systems aus Pyridinnucleotid, Nitro-BT [1] und Phenazinmethosulfat. Das im PFK-Test, der mit Aldolase, Triosephosphatisomerase und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase gekoppelt wird, entstehende NADH reduziert die oben genannten Farbstoffe zu einem unlöslichen Formazan-Komplex, so daß sich die PFK-Bande blau darstellt.

Das herausgedrückte Gel wird im folgenden Ansatz inkubiert:

> 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 7,6, der folgende Zusätze enthält (die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen): NAD^+ 3,8 mM;, AMP 1,7 mM; ATP 0,4 mM; F-6-P 1,4 mM; $MgCl_2$ 3 mM; $K\text{-}PO_4$ 20 mM (Leerwert ohne F-6-P).
>
> 10 ml dieser Lösung wird zugesetzt: 2 mg Nitro-BT, 0,2 mg Phenazinmethosulfat, 1 m Aldolase, 3 mg Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und 1 mg Triosephosphatisomerase.

Nach dem Erscheinen der blauen Bande wird die Reaktion beendet, indem man das Inkubationsmedium durch 3-prozentige Essigsäure ersetzt.

[1] Anmerkung: Verzeichnis der Substanzen und Abkürzungen s.Anhang

1.3. Ergebnisse I:
Isolierung, Reinheitsnachweise und Molekulargewichtsbestimmungen

1.3.1. Ergebnise der Enzymisolierung

(1.) Die ersten drei Schritte der Isolierung: Das Homogenat nach dem Zentrifugieren weist regelmäßig eine spezifische Aktivität zwischen 0,005 und 0,007 auf. Durch die anschließenden zwei Isopropanol-Fällungsschritte, die nach 2 - 3 Stunden beendet sind, wird erreicht, daß in sehr kurzer Zeit eine ungefähr hundertfache Anreicherung erfolgt. Außerdem gelingt mit der zweiten Isopropanol-Fällung die zur Stabilisierung notwendige Konzentrierung.

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, inaktiviert das Enzym während der ersten Isopropanolfällung. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß das Enzym noch sehr verdünnt vorliegt, da beim Konzentrierungsvorgang des zweiten Propanol-(2)-Fällungsschrittes die Inaktivierung fast vollständig reversibel ist.

(2.) Der Verlauf der DEAE-Cellulose-Säulenfraktionierung geht aus der Abbildung 1 hervor. Die PFK-Aktivität erscheint bei einer Phosphatkonzentration von etwa 90 mM. Der kleine Aktivitätsvorpeak ist untypisch und erklärt sich daraus, daß er durch den Proteinpeak mitgerissen wird.

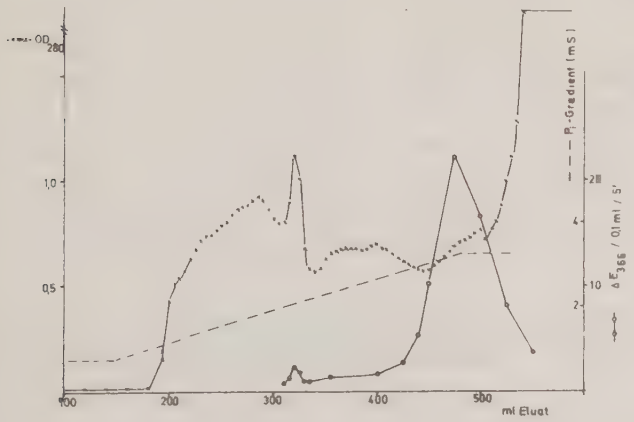


Abbildung 1:
DEAE-Cellulose-Säulenfraktionierung
Säule: 2 x 80 cm,
Gradient vgl. 1.2.1.1
Gesamtvolumen 600 ml
P_i-Konzentration in relativen mS.

(3.) Die Ammoniumsulfat-Fällung wird weniger wegen der Anreicherung als vielmehr zur Konzentrierung durchgeführt. Da das Enzym in dem sehr weiten Bereich von 26 bis 55% Sättigung gleichmäßig präzipitiert, ist die Zunahme der spezifischen Aktivität nur gering.

4. Obwohl bei der Sepharose-4B-Gelfiltration sehr viel Aktivität verlorengeht, ist diese Methode nicht zu entbehren. Da das Enzym gleich nach der Ausschlußgrenze (ca. 20 x 10^6) erscheint, wird eine große Menge kleinerer Fremdproteine abgetrennt.

Abbildung 2 stellt eine typische Gelfiltration dar. Das mit der Ausschlußgrenze erscheinende Protein ist denaturiert und kann ohne Aktivitätsverlust beim nächsten Reinigungsschritt abgetrennt werden.

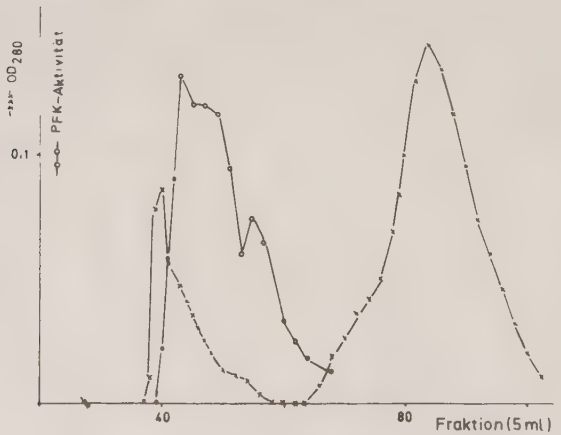


Abbildung 2: Sepharose-4B-Säulenelution
(Erläuterungen im Text s.oben)

(5.) Der Sucrose-Dichtegradient ermöglicht eine weitere Anreicherung ohne einen Aktivitätsverlust, der von Belang wäre. Es werden sowohl Proteine mit höherem Molekulargewicht in der 55- bis 45-prozentigem Sucrosefraktion als auch Proteine mit niedri-

gem Molekulargewicht in der 30- bzw.20-prozentigen Sucrose-fraktion abgetrennt. Das denaturierte Protein von der Sepharose-Säule bleibt in der aufgetragenen Pufferfraktion liegen (vgl. Abbildung 3).

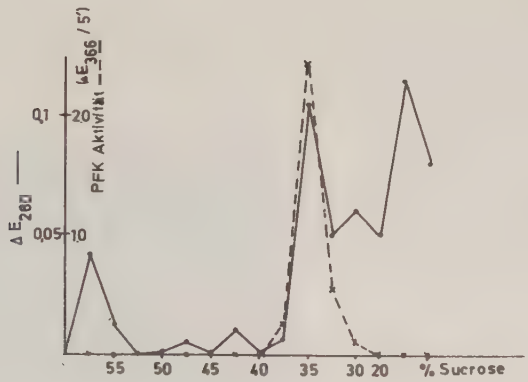


Abbildung 3: Stufenweiser Sucrose-Dichtungsgradient

(6.) Falls nötig, werden letzte Verunreinigungen durch eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Extraktion entfernt. Hierbei löst sich die Enzymaktivität in dem Bereich zwischen 40- und 30-prozentiger Sättigung an Ammoniumsulfat fast gänzlich.

Kristallisationsversuche, die bei der Reinheit des Enzyms eigentlich möglich sein sollten, sind bisher an der geringen Proteinausbeute gescheitert.

(7.) Die Zusammenfassung eines typischen Anreicherungsvorganges wird in Tabelle 1 dargestellt.

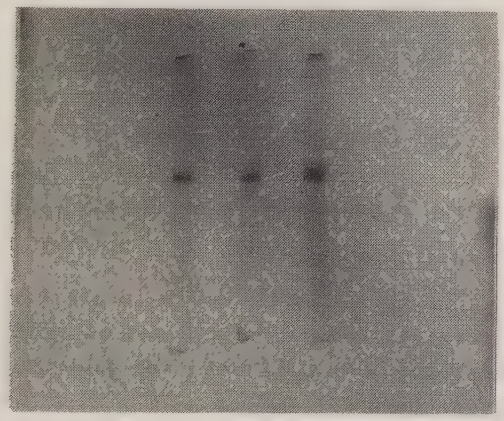
Tabelle 1: Tabellarische Darstellung einer charakteristischen Enzympräparation

Fraktion	Vol. (ml)	E_{366}/1min (20 µl)	Units +) ges.	Protein (mg/ml)	Protein ges. (g)	spez.Akt. (U/mg)	% Ausbeute
Homogenat	3400	0,036	1468,8	85	272	0,0054	100,0
0,11 Vol Propanol-(2)	2340	0,033	987,0	45	105	0,0094	67,2
0,25 Vol Propanol-(2)	161	0,700	1430,0	35,5	57,2	0,25	97,4
DEAE-Cellulose-Eluat	705	0,0837	747,3	0,246	0,173	4,32	50,9
Ammoniumsulfat-Fällung	90	0,560	660,2	1,28	0,115	5,54	44,9
Sepharose 4B-Eluat	50	0,660	413,7	0,198	0,010	42,3	28,2
Sucrose-Gradient	40	0,700	355,3	0,135	0,0054	65,8	24,2
Ammoniumsulfatextraktion (40-35%)	6,85	5,200	226	0,384	0,0026	85,7	15,4

+) 1 unit = 1 µMol FDP gebildet /min

1.3.2. Ergebnisse der Reinheitsnachweise

(1) Da mir zu Beginn der Arbeit die übliche PAA-Gelelektrophorese wegen des Aggregationsverhaltens des Enzyms nicht gelang, habe ich mich der SDS-PAA-Gelelektrophorese als Reinheitsnachweis bedient. Es stellt sich heraus, daß das Enzym auch bei absichtlich überladener Elektrophorese als Einzelbande sichtbar gemacht werden kann. Das bedeutet, daß das Enzym aus Protomeren besteht, die gleiches oder fast identisches Molekulargewicht haben müssen. Selbst bei 50 µg Protein ist keine zweite Bande sichtbar (vgl. Abbildung 4). Das Protein ist enzymatisch nicht mehr aktiv.



(2.) Die 7,5%-ige PAA-Gelelektrophorese erbringt außer der Reinheitskontrolle auch eine Darstellung verschiedener Aggregationszustände. Bei Verwendung einer Elektrophorese mit Zusatz von ATP werden auch bei Enzympräparationen mit hoher spezifischer Aktivität (mehr als 60 U/mg Protein) mindestens 5 Proteinbanden sichtbar. Bei einer zusätzlichen Zugabe von 5 mM Mercaptoäthanol sammelt sich das Enzym in einer einzigen - allerdings etwas unscharfen - Proteinbande (vgl. Abbildung 5), welche noch im spezifischen Farbtest PFK-Aktivität aufweist.

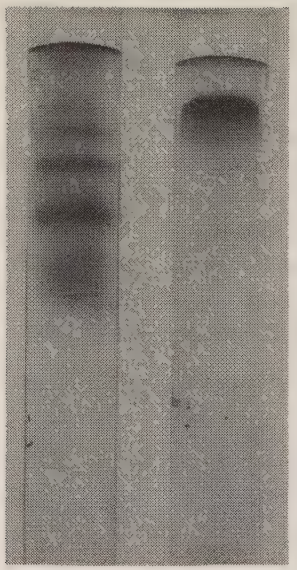


Abbildung 5:
7,5%-ige PAA-Gelelektrophorese der PFK.
Links: Plus ATP,
rechts: Plus ATP plus Mercaptoäthanol.

1.3.3. Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen

(1.) SDS-PAA-Gelelektrophorese: Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Protomerenbande werden als Referenzsubstanzen folgende Proteine benutzt: Rinderserum-Albumin (68.000), Katalase (60.000), Aldolase (40.000) und Chymotrypsinogen (25.700).
Die in den Klammern angegebenen Molekulargewichte beziehen sich auf Angaben der Veröffentlichung von WEBER et al. (1969).

Abbildung 6 zeigt eine Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der SDS-PAA-Gelelektrophorese mit o.g. Referenzsubstanzen. Links: Katalase und Chymotrypsinogen; Mitte: Chymotrypsinogen, Aldolase Katalase, Rinderserum-Albumin und PFK; rechts: PFK.

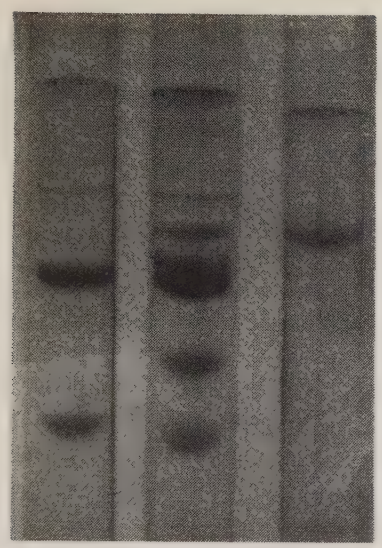


Abbildung 6:

SDS-PAA-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung der Protomere.

Die graphische Auswertung mehrerer Versuche ergab für die PFK-Protomere ein Molekulargewicht von 82.000 (vgl. Abbildung 7).

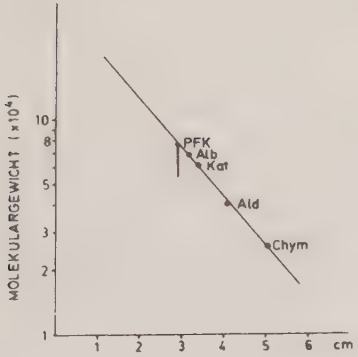


Abbildung 7:

Graphische Darstellung einer Molekulargewichtsbestimmung der PFK-Protomeren mittels einer SDS-PAA-Gelelektrophorese.

(2.) Mit Hilfe einer linearen Acrylamidgradienten-Gelelektrophorese erhalten wir Aufschluß über die Molekulargröße des PFK-Monomers. Als Eichsubstanzen dienen Rinderserum-Albumin (BSA), welches als Mono-, Di-, Tri- und Tetramer einen Molekulargewichtsbereich von 68.000 bis 272.000 eicht. Zusätzlich benutzen wir für den höher molekularen Bereich ß-Galactosidase aus E.coli (SIGMA), welches als Tetrameres ein Molekulargewicht von 535.000 besitzt. Die Hauptbande im Gel besteht aus dem Monomeren mit einem Molekulargewicht (MG) von 135.000. Bei unseren Versuchsbedingungen ist noch eine Dissoziation in eine Untereinheit mit dem halben Monomeren-MG auf, die auch WEBER et al. (1964) finden. Damit kann die Linearität nachgewiesen werden.Die PFK wandert unter den benutzten Bedingungen (vgl. Methoden) als Einzelbande, der bei der graphischen Auswertung ein MG von 365.000 bzw. 325.000 (vgl.Abbildung 8 bzw. 9) entspricht.

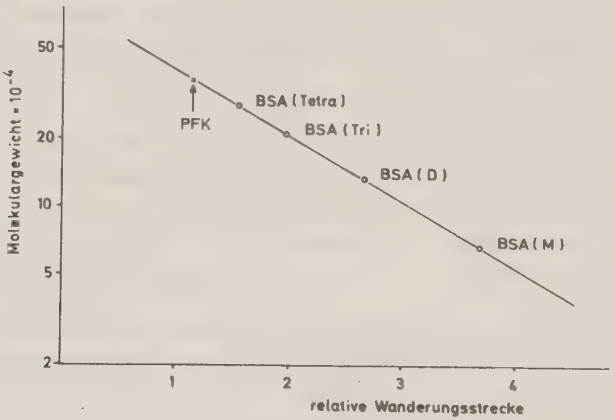


Abbildung 8: Graphische Darstellung eines 3- bis 15-prozentigen linearen PAA-Gelgradienten mit Rinderserum-Albumin (BSA) als Marker-Protein.

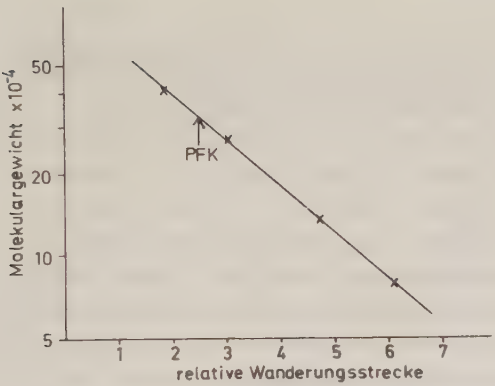


Abbildung 9:

Graphische Darstellung einer PAA-Gelgradientenelektrophorese mit ß-Galactosidase als Eichsubstanz.

1.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Isolierung, Reinheitsnachweise und Molekulargewichtsbestimmungen

Die oben beschriebene Isolierungsmethode führt zu einem homogenen PFK-Präparat mit einer spezifischen Aktivität von ca. 80 U/mg Protein.

Im Hinblick auf die Labilität des Enzyms erweisen sich für die erfolgreiche Reindarstellung folgende Maßnahmen als notwendig: (1.) Das Enzym muß in genügend hohen Konzentrationen gehalten werden. (2.) Das Enzym ist in einer möglichst kurzen Zeit anzureichern. (3.) Als stabilisierende Faktoren müssen SH-Gruppen, F-6-P und Natrium-Fluorid zugesetzt werden.

Durch die SDS-PAA-Gelelektrophorese wird nachgewiesen, daß die PFK aus Rattenleber aus Protomeren besteht, die ein identisches Molgewicht von etwa 82.000 haben, jedoch keine katalytische Enzymaktivität aufweisen.

Mit Hilfe der PAA-Gelgradienten-Elektrophorese wird eine Molekulargewichtsabschätzung des aktiven Enzyms durchgeführt, welches zu einem Wert von etwa 350.000 führt. Unter Berücksichtigung der Ungenauigkeit dieser Methode im Molekulargewichtsbereich über 300.000 ist dennoch anzunehmen, daß die kleinste aktive Enzymform aus 4 Protomeren besteht.

Das Auftreten von mehreren inaktiven Proteinbanden in der PAA-Gelelektrophorese ohne Mercaptoäthanol weist auf ein ausgeprägtes Polymerisationsverhalten hin. Die Zugabe von Mercaptoäthanol verschiebt in diesem Falle das Molgewicht zu einem höheren Aggregat.

Insgesamt wird mit der beschriebenen Isolierungsmethode die Darstellung eines reinen Enzyms erreicht und die Untersuchung auf seine kinetischen Eigenschaften damit möglich.

1.4. Diskussion

Die schwierige Handhabung der PFK aus Rattenleber ist wohl zu einem nicht geringen Anteil auf die im Vergleich zum Muskelgewebe sehr viel niedrigere spezifische Ausgangsaktivität zurückzuführen. Während im Muskelgewebe eine spezifische Aktivität von ungefähr 2 U/mg Protein nachweisbar ist, beträgt die nachweisbare Aktivität im Lebergewebe nur etwa 0,007 U/mg Protein. Eine Konzentrierung der PFK durch Fällungen, zum Beispiel Ammoniumsulfatfällung oder pH-Fällung, in dem Bereich zwischen 5,9 und 5,4 ist nicht erfolgreich gewesen wegen des Verlustes von 30 bis 40% der Gesamtaktivität. Erst die nach LING et al. (1965) variierte Propanol-(2)-Fällung führt zu einem befriedigenden Ergebnis. Dabei ist die Ausbeute stark pH-abhängig. Während bei pH 7,2 - auch in Gegenwart von 1 mM F-6-P - eine totale irreversible Inaktivierung erfolgt, kann die Fällung bei pH 7,6 ohne Verlust durchgeführt werden. Zur Fällung des Leberenzyms wird eine im Vergleich zum Muskelenzym um 0,05 Vol % höhere Sättigung an Propanol-(2) benötigt.

Von der DEAE-Cellulose-Säule wird das Enzym in einem langgezogenen Peak eluiert, dieses scheint eine typische Eigenschaft des Leberenzyms zu sein. Bei Trennungen von Muskel- und Leber-PFK der Ratte auf TEAE- und DEAE-Cellulose (TANAKA et al., 1971 und TAYLOR und BEW, 1970) läßt sich die Muskel-PFK als scharfe Bande eluieren, gefolgt von der Leber-PFK als breiter, die Muskel-PFK etwas überlappender Elutionspeak.
Ob der Verlust an PFK-Aktivität während der Säulentrennung - im günstigsten Falle bleibt noch 70% der Aktivität erhalten - auf Inaktivierung oder auf irreversible Bindung zurückzuführen ist, kann nicht entschieden werden ; denn auch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,3 M ergibt keine bessere Ausbeute. Die Inaktivierung könnte auch auf die erneute Verdünnung zurückzuführen sein, doch würde die stärker konzentrierte Elution durch einen steileren Salzgradienten auf Kosten einer geringeren spezifischen Aktivität erfolgen.

Die Gelfiltration an Sepharose 4B gibt einen Hinweis auf das Aggregationsverhalten der PFK. Da die Proteinausschlußgrenze für Sepharose 4B mit 20×10^6 angegeben wird, muß das Molekulargewicht bei

den angewandten Bedingungen mehrere Millionen betragen; denn die PFK-Aktivität erscheint unmittelbar nach der Auschlußgrenze. Der mehrgipfligeAktivitätspeak läßt auf eine breite Molekulargewichtsstreuung schließen, die in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration in Erscheinung tritt.

Daß diese Molekulargewichtsstreuung abhängig ist von der Proteinkonzentration, läßt sich aus den Ergebnissen der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation ableiten. Hierbei wird das Säuleneluat annäherungsweise auf das Ausgangsvolumen reduziert. Bei dem stufenlosen Dichtegradienten erscheint die PFK-Aktivität als scharfe symmetrische Einzelbande. In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration wandert das Enzym mehr oder weniger weit in den Dichtegradienten ein.Bei einer Konzentration von 1,5 mg/ml wandert die PFK bis in die Region, die einer 35-prozentigen Sucroselösung entspricht, während sie bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml bis zu einer 25-prozentigen Sucrose entsprechenden Region wandert.

Die nach unserem Reinigungsverfahren erhaltene PFK mit einer spezifischen Aktivität von 80 U/mg läßt sich mit der SDS-PAA-Elektrophorese als einzelne Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 82.000 darstellen. Somit besteht die PFK aus Untereinheiten, die zumindest ein identisches oder fast identisches Molekulargewicht besitzen.
Die im Vergleich zum Muskelenzym (PARMEGGIANI et al., 1966) um die Hälfte geringere spezifische Aktivität könnte bedeuten, daß das Leberenzym eine geringere katalytische Aktivität besitzt oder daß ein größerer Anteil des Enzymproteins durch die Präparation katalytisch inaktiv geworden ist.

Das Aggregationsverhalten der Leber-PFK zu hoch molekularen Polymeren machte Schwierigkeiten bei der elektrophoretischen Auftrennung an Polyacrylamid. Durch die starke Konzentrierung des Enzyms vor dem Eintritt in das Trenngel erfolgt offensichtlich eine Assoziation zu so großen Polymeren, daß die Porengröße des Gels nicht ausreicht, um das Protein einwandern zu lassen. Der Zusatz von ATP verschiebt das Gleichgewicht der Assoziation zu kleineren Molekulargewichten (s.Abbildung 5). Bei zusätzlicher Anwesenheit von SH-Gruppen wandert das Enzym als Einzelbande, die unter den Ver-

suchsbedingungen aber noch ein Polymeres des Enzyms darstellt. Erst bei Auftragung geringerer Proteinmengen läßt sich auch im Gelgradienten das Monomer nachweisen, welches ein MG von ungefähr 350.000 besitzt (s.Abb. 8 und 9). Dieses bedeutet, daß das Monomer aus 4 Untereinheiten besteht.
Über das Molekulargewicht der PFK aus Leber liegen keine Angaben vor, doch würde das obengenannte MG bedeuten, daß das Leberenzym ein dem Muskelenzym sehr ähnliches MG besitzt. An diesem Enzym wurde das Aggregationsverhalten und die Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugenläufe intensiv untersucht.

PAETKAU (1968) hat ein MG für das Monomer von ca.380.000 und ein einheitliches Protomergewicht von 93.200 erhalten, welches in 5,5 M Guanidinhydrochlorid noch in 47.000-er Subunits dissoziierte. LEONARD und WALKER (1972) erhielten bei Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsäquilibriumzentrifugation fast identische MG für das Monomer von 340.000 bzw. 330.000 und in Gegenwart von 6 M Guanidinhydrochlorid Molekulargewichte von 83.000 bzw. 76.000. AARONSON und FRIEDEN (1972) kommen zu fast identischen Ergebnissen.

Die Aggregation des Muskelenzyms wird begünstigt durch Erhöhung der Proteinkonzentration, Zunahme des pH-Wertes und Anwesenheit von F-6-P, während die Dissoziation durch geringe Enzymkonzentrationen, pH-Werten kleiner als 7 und ATP erreicht wird (MANSOUR, 1965; MANSOUR et al., 1966; LING et al., 1965; und PAETKAU et al., 1967, 1968).

Über Zusammenhänge zwischen Enzymaktivität und Aggregationszustand liegen bisher keine Ergebnisse vor. Die Schwierigkeit besteht darin, daß die im enzymatischen Test, der bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen und Anwesenheit von Effektoren durchgeführt wird, der molekulare Zustand unbekannt ist. Auch die von mir gefundenen katalytisch inaktiven Aggregationszustände lassen nicht den Schluß zu, daß diese Formen weniger oder gar nicht aktiv sind. Die Elektrophorese ist in Abwesenheit von SH-Gruppen durchgeführt worden, die für die Stabilität des Enzyms essentiell sind. Eine Reaktivierung durch SH-Gruppen ist nicht möglich, da der Tetra-

zoliumfarbstoff auch durch freie SH-Gruppen gebildet wird("Nonsensedehydrogenase", RACKER, 1955). Das Herauslösen der Enzymbande wiederum würde zu unkontrollierbaren Effekten führen.

HOFER (1971) und HULME und TIPTON (1971) finden bei ihren Versuchen zwar eine Abhängigkeit der allosterischen Kinetik von der Enzymkonzentration, nämlich eine geringere ATP-Hemmung und eine zur Halbsättigung erforderliche niedrigere F-6-P-Konzentration, doch ist es fraglich, ob bei den von ihnen verwandten Proteinkonzentrationen (0,002 bis 0,09 mg/ml)nicht eher das Gleichgewicht der Dissoziation zwischen dem Monomer und den Protomeren betroffen ist.
Ob dem Aggregationsverhalten eine physiologische Bedeutung zukommt, ist noch völlig ungeklärt.

2. Kapitel II: Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

2.1. Allgemeine Einführung

Phosphofruktokinase katalysiert eine Reaktion, bei der die beiden Substrate $MgATP^{2-}$ und F-6-P in die Endprodukte $MgADP^{-}$ und FDP umgewandelt werden. Diese Reaktion kann nach CLELAND (1963), dessen Nomenklatur wir in folgenden übernehmen, über zwei grundlegende Mechanismen erfolgen:

Erstens wäre ein Ping-Pong-Mechanismus möglich, wobei das erste Endprodukt vom Protein abdissoziiert, bevor das zweite Substrat gebunden werden kann. Zweitens wäre ein sequentieller Mechanismus denkbar, bei dem beide Substrate an das Enzym gebunden werden, bevor ein Produkt frei wird. Bei diesem Mechanismus kommt nur eine stabile Enzymform vor, nämlich das freie Enzym, während beim Ping-Pong-Mechanismus mehrere stabile Enzymformen auftreten. Man unterscheidet sequentielle Mechanismen danach, ob die Reihenfolge der Substratbindungen festgelegt ist oder variieren kann ("ordered" oder "random"sequentieller Mechanismus).

Über den Mechanismus einiger Phosphotransferasen ist schon viel geforscht worden; dabei sind die drei Hauptmechanismen gefunden worden . Für die Mehrzahl der untersuchten Enzyme wird ein "random-sequential"-Mechanismus angenommen, so u.a. für die Adenylatkinase (RHOADS und LOWENSTEIN,1968; SU et al.,1969), Hexokinase (BACHELARD et al., 1971; RUDOLPH und FROMM,1970) und Kreatinkinase (MORRISON und JAMES,1965). Dagegen scheint die Mevalonatkinase (BEYTIA et al.,1970) nach einem "ordered-sequential"-Mechanismus zu katalysieren. Nur für die Nukleosiddiphosphokinase wird ein Ping-Pong-Mechanismus angenommen (GARCES et al.,1969;MOURAD et al. 1966).

Bei den bisherigen Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Phosphofruktokinase gelangten verschiedene Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen. UYEDA (1970) postulierte für das Skelettmuskelenzym einen Ping-Pong-Mechanismus, konnte aber für widersprüchliche Ergebnisse bei der Isotopenaustausch-Methode keine befriedigende Erklärung anbieten. 1972 veröffentlichte der gleiche Autor Ergebnisse von Kinetiken mit Fruktose-1-P als

Substrat, die auf einen sequentiellen Mechanismus hindeuteten. KEE und GRIFFIN (1972) schlossen auf Grund von Hemmkinetiken auf einen "rapid equilibrium random" Mechanismus.

Um zu eindeutigen Ergebnissen über den Reaktionsmechanismus des Muskelenzyms zu gelangen, sind weitergehende Untersuchungen notwendig. Über die Art des Mechanismus der von der Leber-PFK katalysierten Reaktion haben wir versucht, Aufschluß zu erhalten mit Hilfe (1.) der Anfangsgeschwindigkeitskinetiken und (2.) Hemmkinetiken. Wichtige Voraussetzungen für ein sauberes kinetisches Arbeitensind, daß einmal ein reines Enzym zur Verfügung steht, zum anderen die verwendeten Substanzen auch auf kleinste Verunreinigungen hin überprüft werden. Bei den Untersuchungen zur Klärung des Reaktionsmechanismus der PFK muß unter solchen Versuchsbedingungen gearbeitet werden, daß ein allosterisches Verhalten des Enzyms ausgeschlossen werden kann.

2.2. Kinetische Methoden

2.2.1. Steady-State Kinetik der Hin- und Rückreaktion der PFK

Erste Aufschlüsse über den Typ des Reaktionsmechanismus kann man durch Messungen von Steady-state Kinetiken der Hin- und Rückreaktion erzielen. Hierbei werden bei verschiedenen fixen Konzentrationen des einen Substrats die Konzentrationen des zweiten Substrats variiert. Die Auswertung erfolgt mittels einer doppelt reziproken Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Konzentrationen des variablen Substrates.
Die Parallelität der Geradenschar ist ein erster Hinweis auf einen Ping-Pong-Mechanismus. Für den Fall, daß K_{ia} [1] sehr viel kleiner ist als K_a, muß bei Konzentrationen des fixen Substrats gemessen werden, die weit unterhalb der Michaelis-Menten-Konstanten liegen, um nicht voreilig auf eine Parallelität der Geraden zu schließen.

---

1) Anmerkung: Die kinetischen Konstanten werden nach der Nomenklatur von CLELAND (1963) benannt: K_a, K_b bzw. K_p, K_q bezeichnen die Michaelis-Menten-Konstanten der Substrate bzw. Produkte bei sättigenden Konzentrationen des anderen Reaktionspartners. K_{ia} usw. sind die echten Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-

Schneiden sich die Geraden in einem Punkt, ist ein sequentieller Mechanismus wahrscheinlich.
Die Geraden werden mit Hilfe der "Methode der kleinsten Quadrate" berechnet (vgl.Anhang,Methoden).Die numerische Größe der durch die Versuche zugänglichen Konstanten können durch graphische Auftragungen der Steigungen oder Schnittpunkte der primären doppelt reziproken Auftragung gegen die Konzentrationen des jeweils fixen Substrats ermittelt werden (CLELAND, 1970, s.auch Anhang).

2.2.1.1.Die Hinreaktion der PFK wird unter Bedingungen gemessen, unter denen die ATP-Hemmung auf die Reaktion nicht wirksam wird. Der Testansatz für die Kinetiken , bei denen die F-6-P-Konzentrationen konstant gehalten werden, setzt sich aus folgenden Endkonzentrationen zusammen:

50 mM Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 8,0
0,16 mM NADH, Reinheitsgrad 1
0,64 mM AMP
F-6-P-Konzentrationen, wie unten angegeben,
ATP variiert in jeder Serie von 0,014 mM bis 0,089 mM
Hilfsenzyme: Aldolase 3,3 µg, Triosephosphattisomerase 0,2 (TIM), Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH) 1,48 µg. Die Hilfsenzyme aller kinetischen Messungen,von denen in Kapitel II berichtet wird, werden über eine G-15-Sephadex-Säule, die mit dem Kinetikpuffer äquilibriertist, entsalzt.

Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 40 µl PFK-Lösung (0,15 mg/ml), die ebenfalls über G-15-Sephadex (vgl.oben) entsalzt worden ist. Der Leerwert zu jeder Serie enthält kein ATP. Das Küvettenvolumen beträgt 2,44 ml

Serien:
1. 0,022 mM F-6-P
2. 0,032 mM F-6-P
3. 0,043 mM F-6-P
4. 0,075 mM F-6-P
5. 0,224 mM F-6-P

Die Anfangsgeschwindigkeit wird im Eppendorf-Photometer mit temperiertem Küvettenwechselautomaten bei 30° C und einer Wellenlänge von 334 nm gemessen. Die Extinktionsänderungen werden durch einen zugehörigen Schreiber 10-fach verstärkt aufgezeichnet.

Die Kinetiken, bei denen ATP fixes Substrat ist, werden bei F-6-P-Konzentrationen zwischen 0,095 mM und 1,16 mM gemessen. Dabei va-

riiert ATP in den Serien wie folgt:

Serie:
1. 0,006 mM ATP
2. 0,010 mM ATP
3. 0,017 mM ATP
4. 0,030 mM ATP
5. 0,043 mM ATP

Bemerkung: Das im ATP enthaltene AMP (0,9%) kann vernachlässigt werden, da einerseits die ATP-Konzentration sehr gering ist, die benutzt wird, andererseits dem Testansatz AMP zugesetzt wird.

2.2.1.2. Die von der PFK katalysierte Rückreaktion wird gemessen, indem die beiden entstehenden Produkte, $MgATP^{2-}$ und F-6-P , der Reaktion durch die Hilfsenzyme Hexokinase, Phosphoglukoseisomerase (PGI), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PG-DH) entzogen werden. Dadurch entstehen pro Mol umgesetzten $MgADP^-$ und FDP 4 Mole NADPH. Diese Verstärkung ist sehr wünschenswert, da die Rückreaktion nur ein Bruchteil derjenigen der Hinreaktion beträgt. Dennoch muß für diese Kinetiken eine sehr viel höhere PFK-Konzentration eingesetzt werden.

2.2.1.2.1. Testansätze der Rückreaktionen: Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für $MgADP^-$ bzw. FDP haben wir zuerst die Sättigungskinetiken gemessen. Der Testansatz setzt sich zusammen aus folgenden Endkonzentrationen:

50 mM Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 7,0
3 mM $MgCl_2$
5 mM Mercaptoäthanol
0,36 mM NADP
5,5 mM Glukose
Hilfsenzyme: Hexokinase 8,8 µg, PGI 4,4 µg, G-6-PDH 4,4 µg, 6-PGDH 4,4 µg

Bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der FDP-Konzentration wird diese zwischen 0,05 und 2,42 mM verändert, während die fixe ADP-Konzentration 0,19 mM beträgt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 10 µg PFK gestartet.

Bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der ADP-Konzentration wird die FDP-Konzentration bei 2,42 mM konstant gehalten, während die ADP-Konzentration zwischen 0,002 und 0,95 mM variiert wird. Der Testansatz enthält wiederum 10 µg PFK. Das gesamte Küvettenvolumen beträgt 1,695 ml.
Aus dem LINEWEAVER-BURK-Auftragung werden die K_m-Werte ermittelt.

2.2.1.2.2. Zur Bestimmung des Mechanismus der Rückreaktion werden Versuchsserien durchgeführt, bei denen wiederum bei verschiedenen konstanten, nicht sättigenden Konzentrationen des einen Substrates die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von dem zweiten variierten Substrat bestimmt wird.

Die Endkonzentrationen im Testansatz sind:

50 mM Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 8,0
3 mM $MgCl_2$
5 mM Mercaptoäthanol
0,35 mM NADP
5,0 mM Glukose
0,65 mM AMP
Hilfsenzyme: Hexokinase 8,8 µg, PGI 4,4 µg, G-6-PDH 4,4 µg, 6-PGDH 4,4 µg

Bei fixer ADP-Konzentration variiert die FDP-Konzentration von 0,087 bis 1,52 mM. Die einzelnen ADP-Konzentrationen werden unten aufgeführt. Durch Zugabe von 36 µg PFK wird die Reaktion gestartet.

Serie:
1. 0,035 mM ADP
2. 0,063 mM ADP
3. 0,090 mM ADP
4. 0,263 mM ADP

Bei den Serien mit FDP als fixem Substrat wird der obige Testansatz benutzt, nur werden jetzt 6 Messungen mit ADP-Konzentrationen von 0,009 bis 0,62 mM durchgeführt bei jeweils folgenden fixen FDP-Konzentrationen:

Serie:
1. 0,11 mM FDP
2. 0,22 mM FDP
3. 0,44 mM FDP
4. 1,10 mM FDP

Mit 20 µg PFK werden die Reaktionen gestartet.

2.2.2. Hemmkinetiken

2.2.2.1. Vorbemerkung

Als aufschlußreiche Methode zur Klärung eines Reaktionsmechanismus gelten die Hemmkinetiken, worunter diejenigen die wichtigsten sind, bei denen die Produkte als Inhibitoren fungieren.Ohne die Durchführung solcher Kinetiken sind Angaben zum Reaktionsmechanismus fast immer unsicher.
Der Hemmtyp (nicht kompetitiv, kompetitiv und unkompetitiv) gibt Aufschluß darüber, in welchem Zusammenhang die Reaktion des Enzyms mit dem variierten Substrat und dem zugegebenen Produkt innerhalb der Reaktionsfolge stehen. Konkurrieren das variierte Substrat und das Produkt um die selbe Enzymform, oder ist die Reaktionskette zwischen ihnen nicht durch einen irreversiblen Schritt getrennt, so ist eine kompetitive Hemmung zu beobachten. Ein irreversibler Schritt in einer Reaktionsfolge liegt vor, wenn die Freisetzung des nicht als Inhibitor anwesenden Produkts vor der Bindung des Produktinhibitors erfolgt, oder die Konzentration des fixen Substrates sättigend ist.
Reagieren das zugegebene Produkt und das variable Substrat mit unterschiedlichen Enzymformen, so macht sich dieses bei der doppelt reziproken graphischen Darstellung durch eine Veränderung des Schnittpunktes der Geraden mit der y-Achse bemerkbar, während sich bei der kompetitiven Hemmung alle Geraden in einem Punkt auf der Ordinate schneiden.
Der Hemmtyp kann sich bei Variation der fixen Substratkonzentration ändern. Deshalb ist es ratsam, die Hemmkinetiken jeweils bei Sättigung und bei Nichtsättigung des fixen Substrates durchzuführen.

Die Hemmkinetiken werden durch Messung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Konzentration des einen Substrates bei gleichzeitiger Konstanthaltung der Konzentration des anderen Substrates gemessen, und die für jede Serie konstant bleibende Produktkonzentration variiert.

Die Variationen der von mir durchgeführten Hemmkinetiken werden in Tabelle 2 im Überblick dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsbedingungen der Produkt-Hemmkinetiken

Nr. +)	variiertes Substrat	fixes Substrat	Inhibitor
I	ATP	F-6-P nicht sättigend	ADP
II	ATP	F-6-P sättigend	ADP
III	ATP	F-6-P nicht sättigend	FDP
IV	ATP	F-6-P sättigend	FDP
V	F-6-P	ATP nicht sättigend	FDP
VI	F-6-P	ATP sättigend	FDP
VII	F-6-P	ATP nicht sättigend	ADP
VIII	F-6-P	ATP sättigend	ADP

+) Die laufenden Nummern beziehen sich auf die unten beschriebenen Testansätze I - VIII

2.2.2.2. Testansätze der Produkt-Hemmkinetiken

Für die Kinetiken müssen 2 verschieden gekoppelte optische Tests benutzt werden. Bei der Zugabe von ADP als Produkt-Inhibitor können die üblichen Hilfsenzyme benutzt werden, während bei den FDP-Hemmkinetiken die Reaktion mit Hilfe von Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase gemessen werden. Da die Pyruvatkinase K^+ abhängig ist, wird allen Hemmkinetiken KCl zugesetzt.

Testansätze:

I. Variables Substrat: ATP
Konstant gehaltenes Substrat: F-6-P, nicht sättigend
Inhibitor: ADP

50 mM Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 8,0
3 mM $MgCl_2$
5 mM Mercaptoäthanol
0,15 mM NADH
20 mM KCl
0,9 mM AMP [1)]

1) Anmerkung: Die bis hierher angegebenen Testkonzentrationen bleiben bei allen Hemmkinetiken konstant.

Hilfsenzyme: Aldolase 33 µg, GDH 15 µg, TIM 1,6 µg (diese Hilfsenzymkonzentrationen werden für alle ADP-Hemmkinetiken benutzt.)
F-6-P: 0,123 mM
Die ATP-Konzentrationen in jeder Serie: 8,9; 17,8; 35,6; 53,4; 71,2 und 89,0 µM

Die ADP-Konzentration in den verschiedenen Serien ist:

Serie:
1. 0 mM ADP
2. 0,172 mM ADP
3. 0,344 mM ADP
4. 0,516 mM ADP

Die Reaktion wird durch Zugabe von 2,3 µg PFK gestartet.

ADP haben wir über Ionenaustauscher gereinigt, da es ATP enthält. Dies kann nicht vernachlässigt werden, da die Produktkonzentrationen im Vergleich zu den Substratkonzentrationen wesentlich höher eingesetzt werden (Reinigungsmethode s.Anhang).

II. Variables Substrat: ATP
Konstant gehaltenes Substrat: F-6-P, sättigend
Inhibitor: ADP

Die Testansätze entsprechen den unter I genannten, außer daß die Konzentration des fixen F-6-P im Sättigungsbereich liegt.

F-6-P: 0,701 mM
Die ATP-Konzentrationen in jeder Serie: 9,1; 18,2; 36,4; 54,5; 72,7 und 90,9 µM

Die ADP-Konzentration in den verschiedenen Serien ist:

Serie:
1. 0 mM ADP
2. 0,17 mM ADP
3. 0,351 mM ADP
4. 0,527 mM ADP

Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von 2,3 µg PFK gestartet.

III. Variables Substrat: ATP
Konstant gehaltenes Substrat: F-6-P, nicht sättigend
Inhibitor: FDP

Die allgemeinen Testbedingungen entsprechen denen unter I beschriebenen. Als Hilfsenzyme werden aber hier 3,3 µg Pyruvatkinase und 16,5 µg Laktatdehydrogenase (LDH) verwendet. Diese Mengen an Hilfsenzymen werden für alle FDP-Hemmkinetiken benutzt.

0,51 mM Phosphoenolpyruvat (PEP)
0,129 mM F-6-P
ATP-Konzentrationen in jeder Serie:
8,2; 12,1;16,4; 24,3; 40,5; 64,8 µM.

Die FDP-Konzentrationen in den verschiedenen Serien sind:

Serie:		
	1.	0 mM FDP
	2.	0,86 mM FDP
	3.	1,38 mM FDP
	4.	1,72 mM FDP
	5.	3,44 mM FDP

Die Reaktionen werden durch Zugabe von 2,9 µg PFK gestartet.

IV. Die allgemeinen Testbedingungen entsprechen denen unter III beschriebenen, jedoch liegt die Konzentration des konstant gehaltenen FDP im Sättigungsbereich.

1,14 mM F-6-P
ATP-Konzentrationen in jeder Serie:
8,4; 16,7; 25,1; 41,8; 66,9;83,7 µM.

Die FDP-Konzentrationen der verschiedenen Serien sind:

Serie:		
	1.	0 mM FDP
	2.	0,88 mM FDP
	3.	1,76 mM FDP
	4.	3,50 mM FDP

V. Variables Substrat: F-6-P
Konstantes Substrat: ATP, nicht sättigend
Inhibitor: FDP

Die allgemeinen Testbedingungen entsprechen den unter III beschriebenen.

0,041 mM ATP
Die F-6-P-Konzentrationen variieren in jeder Serie zwischen 10 und 125 µM.

Die FDP-Konzentration in den Serien ist:

Serie:		
	1.	0 mM FDP
	2.	1,08 mM FDP
	3.	3,23 mM FDP
	4.	4,31 mM FDP

Die Reaktion wird jeweils mit 5 µg PFK gestartet.

VI. Variables Substrat: F-6-P
Fixes Substrat: ATP, sättigend
Inhibitor: FDP

Die allgemeinen Testbedingungen entsprechen den unter III beschriebenen.

0,24 mM ATP
F-6-P variiert in diesen Serien zwischen 10 und 114 µM.

Die FDP-Konzentration in den Serien ist:

Serie:	1.	0 mM FDP
	2.	1,24 mM FDP
	3.	2,48 mM FDP
	4.	3,71 mM FDP

Die Reaktion wird jeweils mit 5 µg PFK gestartet.

VII. Konstantes Substrat: ATP, nicht sättigend
Variiertes Substrat: F-6-P
Inhibitor: ADP

Die allgemeinen Testbedingungen entsprechen den unter I beschriebenen.

0,046 mM ATP
F-6-P-Konzentrationen in jeder Serie:
42; 70; 112; 140; 210; 310 und 620 µM.

Die ADP-Konzentration in den verschiedenen Serien:

Serie:	1.	0 mM ADP
	2.	0,11 mM ADP
	3.	0,22 mM ADP
	4.	0,33 mM ADP

Die Reaktion wird jeweils mit 2,8 µg PFK gestartet.

VIII. Konstantes Substrat: ATP, sättigend
Variiertes Substrat: F-6-P
Inhibitor: ADP

Die allgemeinen Testbedingungen entsprechen den unter I beschriebenen.

0,159 mM ATP
F-6-P-Konzentrationen in jeder Serie:
44; 74; 119; 148; 222 und 328 µM

Die Konzentration an ADP in den verschiedenen Serien ist:

Serie:	1.	0 mM ADP
	2.	0,18 mM ADP
	3.	0,26 mM ADP

Mit jeweils 2,3 µg PFK wird die Reaktion gestartet.

2.3. Ergebnisse II:

2.3.1. Ergebnisse der Steady-State-Kinetik der Hin- und Rückreaktion der PFK

2.3.1.1. Ergebnisse der Steady-State-Kinetik der Hinreaktion der PFK

Die ersten von mir durchgeführten Versuche zur Messung der Hinreaktion der PFK und deren graphische Auswertung in der doppelt reziproken Darstellung ergaben Geraden mit gleichen Steigungen. Dies wäre ein erster Hinweis für einen möglichen Ping-Pong-Mechanismus gewesen. Da die Rückreaktion jedoch eindeutig nach einem anderen Mechanismus verläuft und es unmöglich ist, daß nur die Hinreaktion über einen stabilen Zentralkomplex geht, mußten die ersten Ergebnisse näher überprüft werden.
Während sich schneidende Geraden eindeutig auf einen sequentiellen Mechanismus hindeuten, ist bei parallelen Geraden zu überprüfen, ob nicht doch ein Schnittpunkt, weit entfernt vom Koordinatenursprung, existiert. Es sind daher Messungen mit extrem niedrigen Konzentrationen des jeweils konstanten Substrates durchgeführt, die eindeutig sich schneidende Geradenscharen ergeben. Dies ist ein erster Anhaltspunkt für einen sequentiellen Mechanismus der PFK aus Lebergewebe.

In Abbildung 10 ist eine Meßwertreihe dargestellt, bei der jeweils ATP konstant gehalten worden ist bei Variation der Konzentrationen an F-6-P. Die graphische Ermittlung der Konstanten aus diesem Versuch ist in Abbildung 11 wiedergegeben.

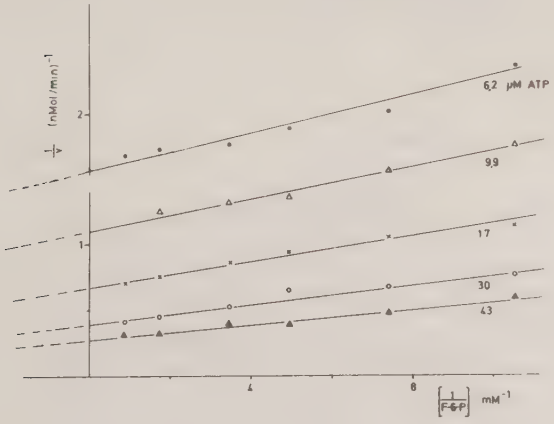


Abbildung 10: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeiten von F-6-P bei konstanten ATP-Konzentrationen. (Weitere Testbedingungen s. Methoden).

Beim Lesen der Abbildungen ist zu beachten, daß das Substrat des Enzyms nicht ATP, sondern $MgATP^{2-}$ ist. Während in allen Versuchen die Mg^{2+}-Konzentration auf 3 mM konstant gehalten wird, variiert die ATP-Konzentration. Aus der K_{Diss} = 0,019 mM für $MgATP^{2-}$ bei 35^{O} C nach ROSE et al. (1966) und den pK-Werten für ATP (6,97 u. 3,93) geht hervor, daß bei pH 8,0 ATP so gut wie vollständig als gebundenes $MgATP^{2-}$ vorliegt.

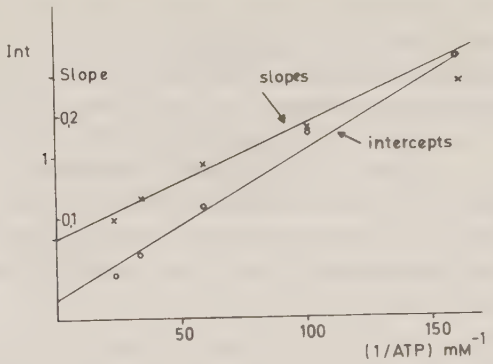


Abbildung 11: Replots der in Abbildung 10 dargestellten Versuche. Die graphische Ermittlung der Konstanten erfolgt nach der Methode von CLELAND (1967), vgl. auch Anhang, Methoden.

In Abbildung 12 wird eine Meßwertreihe dargestellt, bei der die F-6-P Konzentration jeweils konstant gehalten wird, während die ATP-Konzentration variiert.
Die graphische Ermittlung der Konstanten ist in Abbildung 13 dargestellt.

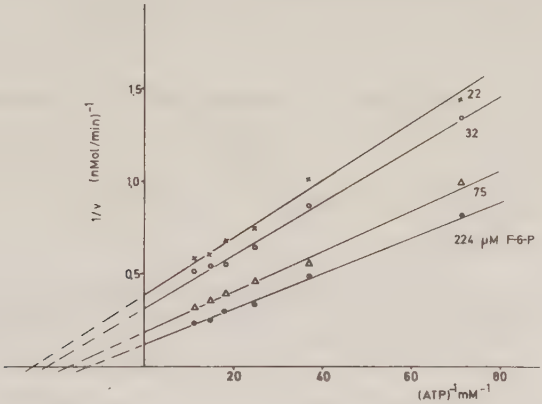


Abbildung 12: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der ATP-Konzentration bei konstant gehaltener F-6-P-Konzentration. (Weitere Testbedingungen s.2.2.1.1.)

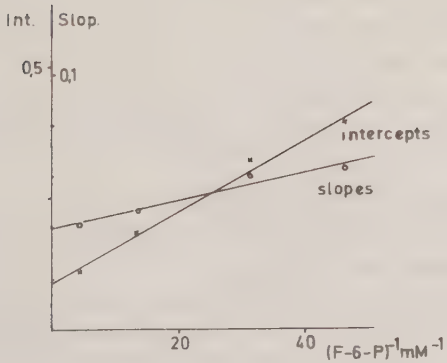


Abbildung 13: Replots der in Abb. 12 dargestellten Versuche. (Methode der Auswertung s. Anhang)

Die aus diesen Versuchen ermittelten Konstanten sind in Tabelle3 zusammenfassend dargestellt. Die Berechnung ist möglich, da die Ergebnisse der Produkt-Hemmkinetiken (s.2.3.2.) über den genauen Reaktionsmechanismus der Leber-PFK Aufschluß ergeben haben.

Tabelle 3: Zusammenfassung der für die Hinreaktion ermittelten kinetischen Konstanten

Konstante	Versuch vgl. Abb.10,11 (mM)	Versuch vgl. Abb. 12,13 (mM)
$K_{MgATP^{2-}}$	0,112	0,111
K_{F-6-P}	0,335	0,077
K_{iF-6-P}	0,026	0,012

Die großen Differenzen, die sich für die K_{F-6-P}-Werte aus den verschiedenen Versuchen ergeben, erklären sich aus den methodischen Schwierigkeiten.Der K_{F-6-P}-Wert von 0,335 mM und auch der K_{iF-6-P}-Wert von 0,026 mM ist berechnet nach dem Replot der Geradensteigungen , die in Abb.10 dargestellt sind. Es muß berücksichtigt werden,daß der Replot mit einem relativ großen Fehler behaftet ist, da die Steigungsdifferenzen zwischen den Geraden sehr klein sind(s. Abb.11). Deshalb werden für diese Konstanten nur die Werte berücksichtigt, die sich aus Abb.12,13 ergeben.

2.3.1.2. Ergebnisse der Rückreaktionskinetiken

Die Messungen der Rückreaktion bestätigen die Hypothese, daß hier ein sequentieller Mechanismus vorliegt.

Die Sättigungskinetiken entsprechen Michaelis-Menten-Kinetiken und ergeben im Lineweaver-Burk-Plot eine lineare Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit 1/v gegenüber 1/S. ADP erzeugt in hohen Konzentrationen eine Substrathemmung (vgl. Abb.14).

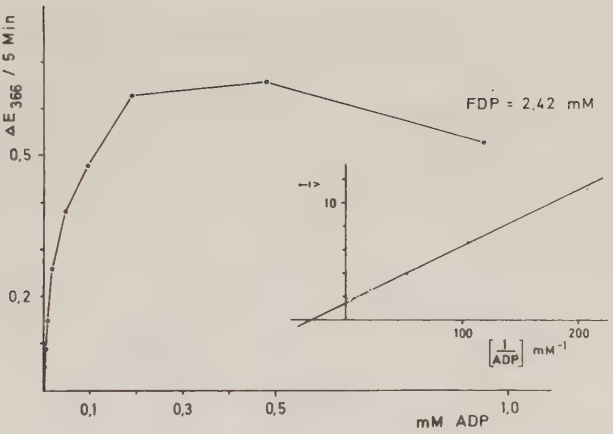


Abbildung 14: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit für die Rückreaktion von ADP bei Sättigung an FDP und ihre doppelt reziproke Darstellung. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.1.2.1.)

Aus der graphischen Auswertung nach LINEWEAVER-BURK geht hervor, daß die MICHAELIS-Konstante für ADP bei der oben genannten FDP-Konzentration bei 0,032 mM liegt. Bei unseren Versuchsbedingungen liegt ADP kaum frei vor, sondern als $MgADP^-$-Komplex; denn die Dissoziationskonstante ist 0,30 mM (ROSE et al.,1966).

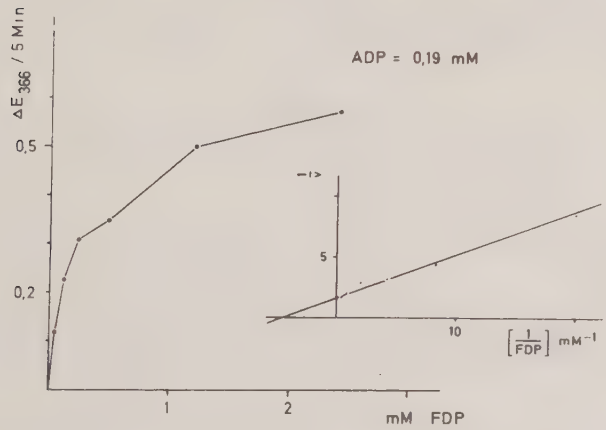


Abb. 15: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Rückreaktion von der FDP-Konzentration und Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.1.2.1.)

Die Auswertung ergibt eine app. K_m für FDP in Höhe von 0,24 mM.

Unter optimalen Bedingungen gemessen beträgt die Rückreaktionsrate 3% von der Hinreaktion.

Die Untersuchungen zum Mechanismus der Rückreaktion lassen darauf schließen, daß in der Reaktionskette kein stabiler Zentralkomplex auftaucht. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen eindeutig sich schneidende Geraden , wobei der Schnittpunkt jeweils oberhalb der Abszisse liegt.

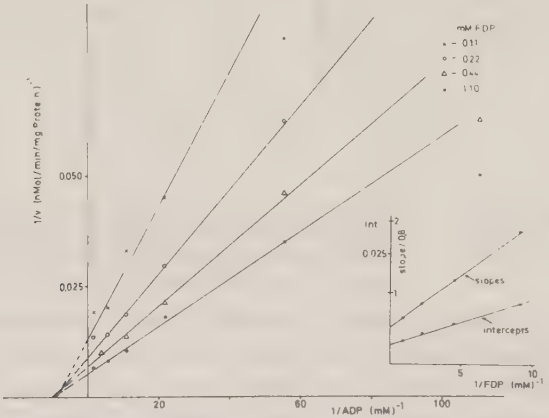


Abbildung 16: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der ADP-Konzentration bei unterschiedlich hohen FDP-Konzentrationen und Replots der Steigungen und der Schnittpunkte mit der Ordinaten. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.1.2.2.)

Die aus diesen Versuchsreihen resultierenden Konstanten sowie die Ergebnisse des in den Abbildungen 17 und 18 ausgewerteten Versuches werden in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Konstante	K_{MgADP^-}	K_{FDP}	K_{iFDP}
Versuch zu Abb.16	0,140 mM	0,427 mM	1,60mM
Versuch zu Abb.17,18	0,056 mM	0,370 mM	1,41 mM

Tab. 4: Zusammenfassung der für die Rückreaktion ermittelten kinetischen Konstanten.

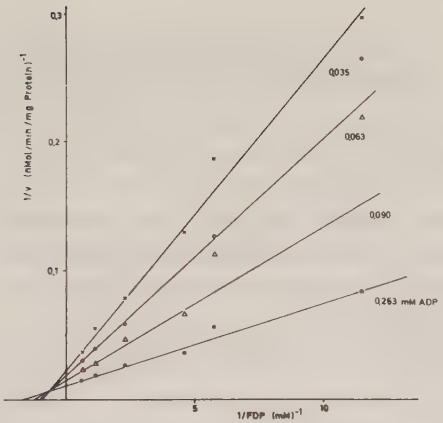


Abbildung 17: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der FDP-Konzentration bei unterschiedlich hohen ADP-Konzentrationen. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.1.2.2.)

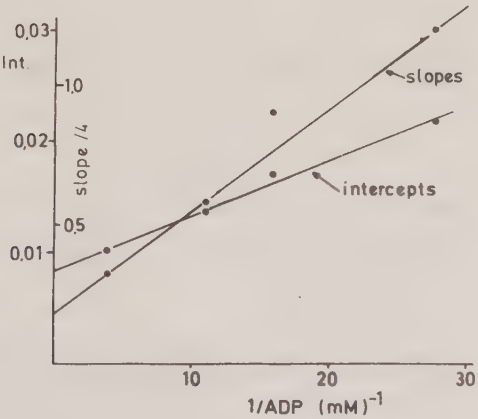


Abbildung 18: Replots der Steigungen und Schnittpunkte mit der Ordinate der in Abb.17 dargestellten Geraden.

2.3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Steady-State-Kinetiken der Hin- und Rückreaktion

Die Auswertung der Steady-State-Kinetiken der Hin-und Rückreaktion in doppelt reziprokem Diagramm ergibt immer eine sich in einem Punkt schneidende Geradenschar. Dieses weist auf einen sequentiellen Reaktionsmechanismus hin. Für die Hinreaktion ergeben sich Schnittpunkte unterhalb der Abszisse, d.h. die K_m-Werte für das variable Substrat steigen bei Erhöhung des fixen Substrates.

Für die Rückreaktion dagegen verkleinern sich die K_m-Werte für das variable Substrat bei Erhöhung der Konzentrationen des fixen Substrates,was sich bei den graphischen Auswertungen der Versuchsreihen zur Messung der Rückreaktion deutlich durch die oberhalb der Abszisse liegenden Schnittpunkte zeigt.
Als kinetische Konstanten haben sich folgende Werte ermitteln lassen:

$K_{MgATP}{}^{2-}$ = 0,112 mM K_{F-6-P} = 0,077 mM

K_{iF-6-P} = 0,012 mM

$K_{MgADP}{}^{-}$ = 0,056 mM K_{FDP} = 0,427 mM

K_{iFDP} = 1,46 mM

Nach der HALDANschen Beziehung läßt sich die Gleichgewichtskonstante für die PFK-Reaktion wie folgt berechnen:

$$K_{eq} = \frac{V_1}{V_2} \times \frac{K_{MgADP^-} \cdot K_{iFDP}}{K_{MgATP^{2-}} \cdot K_{iF-6-P}} = 2{,}1 \times 10^4 \quad (\text{pH } 8{,}0 \text{ und } 30^{\circ}\text{C})$$

Bei dieser Berechnung wird berücksichtigt, daß das Verhältnis $V_1 : V_2$ gleich 33,3 ist.

2.3.2. Ergebnisse der Produkt-Hemmkinetiken

2.3.2.1. ADP-Hemmtyp gegenüber ATP bei nicht sättigendem, konstantem zweiten Substrat

Die nächste Abbildung veranschaulicht, daß ADP ein nicht kompetitiver Hemmer gegenüber ATP ist. Die Hemmkonstanten lassen sich aus den Replots der Steigungen und der Schnittpunkte mit der Ordinate gegen die Konzentrationen des Produktinhibitors, ADP, ermitteln. Bei einer linearen Abhängigkeit entspricht der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse der negativen Hemmkonstanten. Bei der in Abbildung 19 dargestellten Versuchsserie lassen sich folgende Konstanten ermitteln:

$K_{i\ slope}$ = o,34 mM ADP und $K_{i\ intercept}$ = O,51 mM ADP .

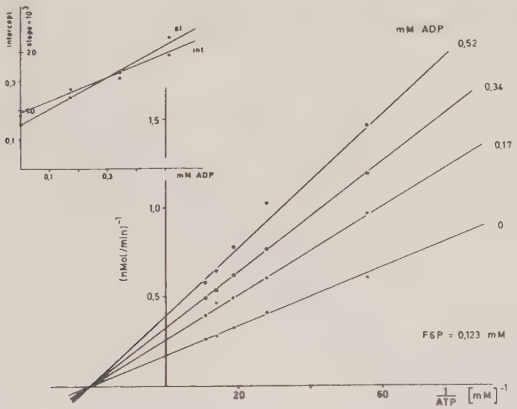


Abbildung 19: Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit durch ADP bei bei variierten ATP-Konzentrationen und einer nicht sättigenden Konzentration an F-6-P. (Vgl. weitere Testbedingungen unter 2.2.2.1.,I)

2.3.2.2. ADP-Hemmtyp gegenüber ATP bei sättigender konstanter Konzentration des zweiten Substrates

Durch die Sättigung an F-6-P als konstantem Substrat wird keine Veränderung der Hemmwirkung durch ADP erzeugt. Auch die Hemmkonstanten sind innerhalb der methodischen Fehlerbreite identisch mit den Hemmkonstanten, die sich bei den Versuchen mit nicht sättigenden Konzentrationen an F-6-P ergeben haben. Als Konstanten lassen sich errechnen: $K_{i\ slope}$ = 0,36 mM ADP und $K_{i\ intercept}$ = 0,52 mM ADP. Dieser Versuch ist in Abbildung 20 dargestellt.

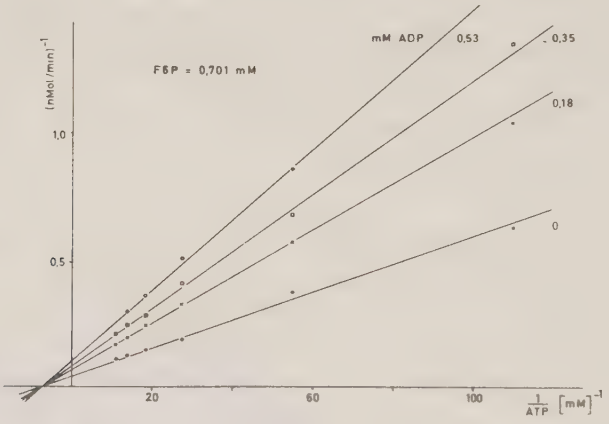


Abbildung 20: Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit durch ADP bei variierten Konzentrationen an ATP und einer sättigenden Konzentration an F-6-P. (Vgl. weitere Versuchsbedingungen unter 2.2.2.1.,II)

2.3.2.3. FDP-Hemmtyp gegenüber ATP bei nicht sättigender konstanter Konzentration des zweiten Substrates

Gegenüber ATP erweist sich das Endprodukt FDP als nicht kompetitiver Hemmer. Die Hemmkonstanten, ausgewertet durch Replots der Steigungen und Schnittpunkte mit der Ordinate, ergeben für $K_{i\ slope}$ 7,73 mM, für $K_{i\ intercept}$ 7,0 mM FDP .

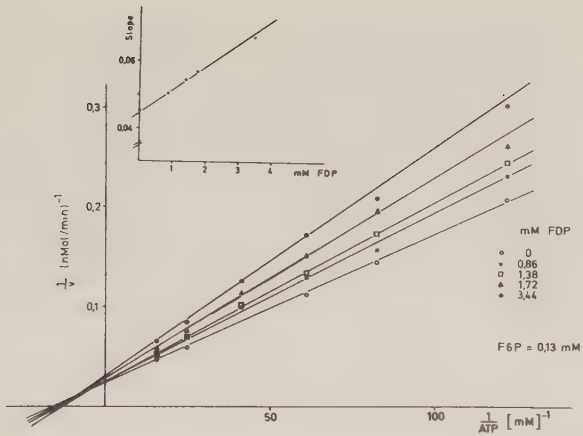


Abbildung 21: FDP-Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit mit ATP als variiertem Substrat und F-6-P als konstantem nicht sättigendem zweiten Substrat. (Vgl. weitere Testbedingungen unter 2.2.2.1.,III)

2.3.2.4. FDP-Hemmtyp gegenüber ATP bei sättigender konstanter Konzentration des zweiten Substrates

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, wird die Hemmwirkung von FDP auf die Anfangsgeschwindigkeit durch sättigende Konzentrationen an F-6-P überwunden. Die Kinetiken,mit und ohne FDP durchgeführt, ergeben in der doppelt reziproken Darstellung deckungsgleiche Geraden.

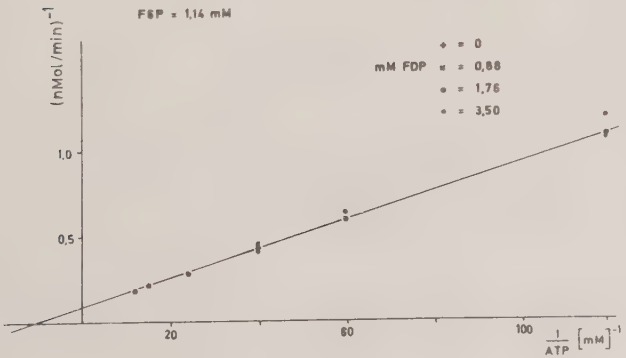


Abb.22: Einfluß verschiedener FDP-Konzentrationen auf die Anfangsgeschwindigkeit bei sättigender Konzentration an F-6-P und variiertem ATP. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.2.1., IV.)

2.3.2.5. FDP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei nicht sättigender konstanter Konzentration an ATP

Die FDP-Hemmung erweist sich gegenüber F-6-P als kompetitiv. Die Berechnungen der Hemmkonstanten aus der in Abbildung 23 dargestellten Versuchsserie ergeben Werte von $K_{i\ slope}$ 4,3 mM FDP gegenüber einer $K_{i\ intercept}$ von 37,2 mM FDP. Aus diesen Werten ist zu folgern, daß die Hemmung kompetitiv ist, obwohl der Schnittpunkt der Geraden in Abb.23 nicht genau auf der Ordinate liegt.

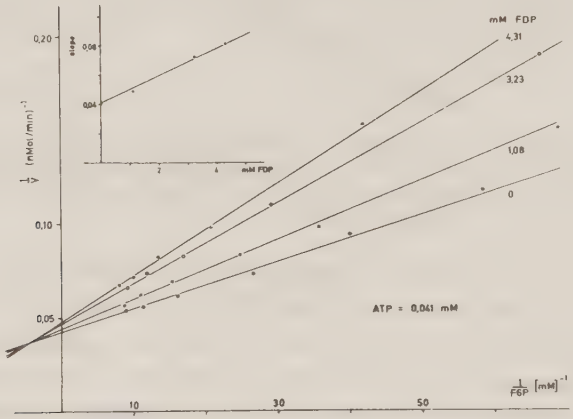


Abbildung 23: FDP-Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit bei variierten F-6-P-Konzentrationen und konstanter nicht sättigender Konzentration von ATP. (Vgl. weitere Versuchsbedingungen unter 2.2.2.1.,V.)

2.3.2.6. FDP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei sättigender Konzentration an ATP

Wie Abbildung 24 zeigt, wird die Hemmung durch FDP infolge Sättigung an ATP unkompetitiv gegenüber F-6-P, wobei eine Hemmkonstante $K_{i\ intercept}$ von 6,37 mM bestimmt worden ist.

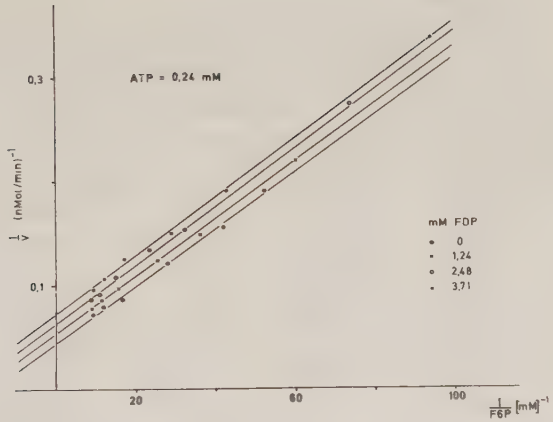


Abbildung 24: FDP-Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit bei variierten F-6-P-Konzentrationen und konstanter sättigender Konzentration an ATP. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.2.1.,VI.)

2.3.2.7. ADP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei nicht sättigender konstanter Konzentration von ATP

Die Versuchsserie wird in Abbildung 25 wiedergegeben. Sie stellt einen reinen, nicht kompetitiven Hemmtypus dar. Die Hemmkonstanten sind $K_{i\ slope}$ = 0,37 mMFDP und $K_{i\ intercept}$ = 0,32 mM FDP.

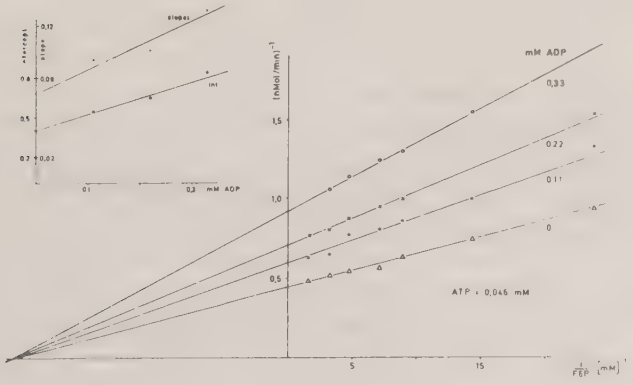


Abb. 25: ADP-Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit bei variiertem F-6-P und konstanter nicht sättigender ATP-Konzentration. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.2.1.,VII.)

2.3.2.8. ADP-Hemmtyp gegenüber F-6-P bei sättigender konstanter ATP-Konzentration

Durch Erhöhung der ATP-Konzentration bis zur Sättigung verändert sich die Hemmung durch ADP derart, daß aus einer nicht kompetitiven Hemmung eine unkompetitive Hemmung wird (vgl. Abb.26). Die berechnete Hemmkonstante ist $K_{i\ intercept}$ = 0,16 mM ADP .

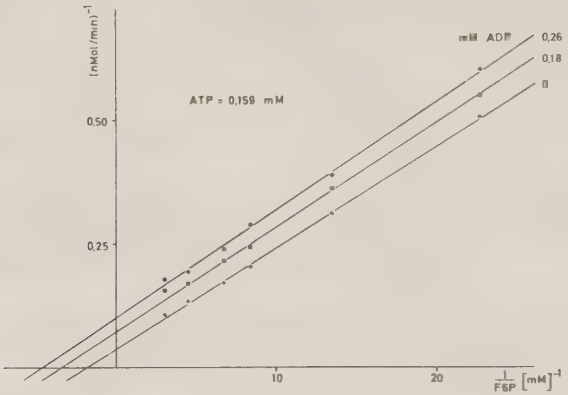


Abbildung 26: ADP-Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit bei variierten F-6-P-Konzentrationen und einer konstanten sättigenden ATP-Konzentration. (Vgl. weitere Bedingungen unter 2.2.2.1.,VIII.)

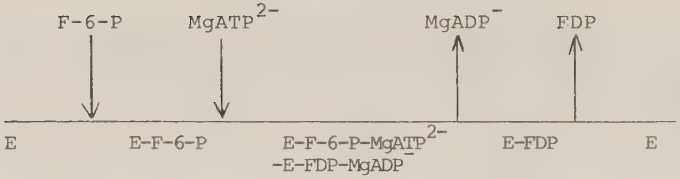
2.3.2.9. Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten Hemmkinetiken

Um einen Überblick über die aus den hemmkinetischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse zu gewinnen, wird eine tabellarische Zusammenfassung vorgenommen (vgl. Tab. 5).

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung aller aus den Produkt-Hemmkinetiken erzielten Ergebnisse

Variierte Substrat	Konstantes Substrat	Inhibitor	Hemmtyp	Hemmkonstante K_i (mM)
ATP	F-6-P nicht sättigend	ADP	nicht-kompetitiv	slope: 0,36 intercept: 0,52
	F-6-P sättigend	ADP	nicht-kompetitiv	slope: 0,34 intercept: 0,51
	F-6-P nicht sättigend	FDP	nicht-kompetitiv	slope: 7,7 intercept: 7,0
	F-6-P sättigend	FDP	--	--
F-6-P	ATP nicht sättigend	FDP	kompetitiv	slope: 4,3 intercept: 37,2
	ATP sättigend	FDP	unkompetitiv	intercept: 6,37
	ATP nicht sättigend	ADP	nicht-kompetitiv	slope: 0,37 intercept: 0,32
	ATP nicht sättigend	ADP	unkompetitiv	intercept 0,16

Anhand der hier vorgelegten Ergebnisse, sowohl aus den Messungen der Hin- und Rückreaktionen als auch aus den Bestimmungen der Produkthemmungen für die Hinreaktion, läßt sich für die Phosphofruktokinase aus Rattenleber folgender Reaktionsmechanismus aufstellen: (1.) Die Bindung der Substrate und die Freisetzung der Produkte erfolgt nach einem "ordered sequential"Mechanismus. (2.) Dabei wird F-6-P als erstes Substrat von dem freien Enzym gebunden, ATP folgt als zweites Substrat. (3.) Die Produktfreisetzung erfolgt in der Reihenfolge ADP, dann FDP. (4.) Der Mechanismus läßt sich nach dem Modell von CLELAND (1967) darstellen.



(5.) CLELAND fordert für dieses Modell (a) eine lineare kompetitive Hemmung von FDP gegenüber F-6-P, (b) eine lineare nicht-kompetitive Hemmung von FDP gegenüber ATP, die durch Sättigung an F-6-P aufgehoben wird, (c) eine lineare nicht-kompetitive Hemmung von ADP gegenüber F-6-P, die bei Sättigung an ATP unkompetitiv wird, (d) eine nicht-kompetitive Hemmung von ADP gegenüber ATP, die nur bei äußerst geringen Konzentrationen an F-6-P kompetitiv ist.

Die in Tabelle 5 zusammengestellten Daten aus unseren Untersuchungen entsprechen den CLELAND'schen Forderungen für 7 von 8 geforderten Bedingungen.Eine Abweichung tritt auf bei Bedingung (a). Die kompetitive Hemmung von FDP gegenüber F-6-P geht bei unseren Untersuchungen durch die Sättigung an ATP in eine unkompetitive Hemmung über.
Zu den unter (d) genannten Bedingungen nach CLELAND steht die in unseren Untersuchungen unveränderte nicht-kompetitive Hemmung nicht in Widerspruch, da die Messungen bei genügend niedrigen Konzentrationen an F-6-P nicht durchgeführt werden konnten.
(6)Ein anderer als der zur Deutung unserer Ergebnisse herangezogener Mechanismus, zum Beispiel ein "random sequential-"oder ein "rapid-equilibrium"-Mechanismus, muß nach den vorliegenden Daten ausgeschlossen werden (s.Diskussion).

2.4. Diskussion

2.4.1. Diskussion der Ergebnisse der Steady-State-Kinetiken der Hin- und Rückreaktion

Nach CLELAND (1967) sind Steady-State-Kinetiken der Hin- und Rückreaktion und Produkthemmkinetiken ein nicht zu umgehendes Mittel bei der Aufklärung von Reaktionsmechanismen. Der Befund von parallelen Geraden in der doppelt reziproken Darstellung der Hinreaktion in fast allen veröffentlichten PFK-Kinetikuntersuchungen (außer LOWRY und PASSONEAU,1966 und UYEDA,1972) führte zu der Hypothese, daß die PFK-Reaktion einem Ping-Pong-Mechanismus folge.
Nach ersten Messungen, die anscheinend parallelen Geraden in der doppelt reziproken graphischen Darstellung ergaben, neigten auch wir zu dieser Arbeitshypothese. Dieses hätte vorausgesetzt, daß zwei stabile Enzymformen im Mechanismus auftreten, einerseits das freie Enzym, zum anderen eine stabile durch ATP phosphorylierte Enzymform. Die Messungen der Rückreaktion haben eindeutig dieser Hypothese widersprochen. Messungen bei Substratkonzentrationen, die weit unter ihrem K_m-Wert liegen, ergeben auch für die Hinreaktion sich schneidende Geraden, was einem sequentiellen Mechanismus entspricht (s.Abbildung 10,12). Es geht aus diesen Messungen außerdem hervor, daß die Bindung eines Substrates durch die Anwesenheit des anderen negativ beeinflußt wird, während bei der Rückreaktion die Anwesenheit von FDP oder ADP die Bindung des jeweils anderen Reaktionspartners erleichtert.

Ein Vergleich der erhaltenen kinetischen Konstanten mit den in der Literatur veröffentlichten ist schwierig. Für die Leber-PFK gibt es bisher noch keine vergleichbaren Messungen. UYEDA(1969, 1972) hat bei seinen Untersuchungen ITP an Stelle von ATP, bzw. Fruktose-1-Phosphat an Stelle von F-6-P benutzt. Doch geht aus einigen anderen Untersuchungen hervor, daß die vergleichbaren Konstanten bei Enzympräparationen aus anderen Geweben zum Teil ähnlich sind. So hat LOWRY et al. (1966) Michaelis-Konstanten von 0,104 mM für ATP und 0,04 mM für F-6-P aus Messungen mit dem Muskelenzym bei pH 8,1 berechnet. KEE und GRIFFIN (1972) erhalten mit dem gleichen Enzym, allerdings bei pH 8,5, Konstan-

Die nach der Gleichung von HALDANE berechnete Gleichgewichtskonstante von $2{,}1 \times 10^4$ gibt an, wie sehr das Gleichgewicht der Reaktion F-6-P + $MgATP^{2-} \rightleftharpoons MgADP^{-}$ + FDP auf Seiten der Produkte MgADP und FDP liegt.

Nach NEWSHOLME und START (1973) berechneten BURTON und KREBS schon im Jahre 1953 aus der Standardreaktionsarbeit die Gleichgewichtskonstante der PFK.

Aus der Standardreaktionarbeit (ΔG°) der ATP-Hydrolyse und der F-6-P- und FDP-Bildung in wäßriger Lösung ergab sich ein ΔG° von -4.2 kcal/Mol und nach $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K'$ die Gleichgewichtsstante von K = 940 bei pH 7,0 und 37° C.
Der von ihnen berechnete Wert liegt also um den Faktor von ungefähr 20 unter dem von uns gemessenen. Ein direkter Vergleich ist nicht möglich, da die Versuchsbedingungen stark voneinander abweichen.
Aus Bestimmungen von Metabolitkonzentrationen der Rattenleber läßt sich nach dem Massenwirkungsgesetz das Verhältnis der Substrate und Endprodukte bestimmen. GREENBAUM et al. (1971) bestimmten das Verhältnis wie folgt:

$$\frac{(ADP) \times (FDP)}{(ATP) \times (F\text{-}6\text{-}P)} = \frac{906 \times 11{,}5}{1020 \times 60{,}4} = 0{,}090$$

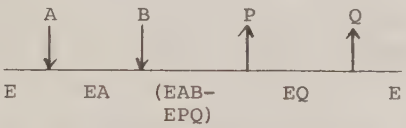
(Die Konzentrationsangaben sind in nMol/g Feuchtgewicht angegeben).

Hieraus geht hervor, daß die von der PFK katalysierte Reaktion in vivo eindeutig im Ungleichgewicht ist, welches die Folge eines regulatorisch wirksamen Enzymes ist.

2.4.2. Diskussion der Ergebnisse der Produkthemmkinetiken

Für die Aufklärung eines Reaktionsmechanismus sind Produkthemmkinetiken äußerst aufschlußreich und ermöglichen bei intensiver Untersuchung oft schon differenzierte Aussagen. Vor allem bei Durchführung von Produkthemmkinetiken mit nicht-sättigenden und sättigenden Konzentrationen des fixen Substrates sind genauere Bestimmungen des Mechanismus zu erhalten, da bei sättigenden Konzentrationen ein irreversibler Schritt in dem Reaktionsablauf erzeugt wird.

Unsere Befunde schließen eindeutig einen Ping-Pong-Mechanismus aus, da sich hierbei die jeweils ähnlichen Reaktionspartner kompetitiv beeinflussen, was bei uns nicht der Fall ist.
Drei nichtkompetitive und ein kompetitiver Hemmtyp treten bei einem " ordered sequential" Mechanismus auf.



Wenn B das variable Substrat ist, sollte durch sättigende Konzentrationen an A die nichtkompetitive Hemmung durch Q aufhebbar sein. Dies gilt nur für den Fall, daß die Dissoziationskonstante für Q nicht sehr viel kleiner ist als für A, da dann die Konzentration an A evtl. nicht hoch genug ist, um die Hemmung total reversibel zu machen. Die nichtkompetitive Hemmung durch P muß unter diesen Bedingungen unbeeinflußt bleiben. Bei unseren Versuchen treten diese Effekte auf, wenn ATP als variables Substrat eingesetzt wird.

Wenn A das variable Substrat ist, wird die nichtkompetitive Hemmung durch P bei Sättigung an B unkompetitiv, da dann zwischen A und P ein irreversibler Schritt liegt. Die Steigung der Geraden bei der doppelt reziproken Darstellung wird nur beeinflußt, wenn Inhibitor und variables Substrat mit derselben Enzymform reagieren oder die Reaktionssequenz zwischen beiden nicht durch einen irreversiblen Schritt getrennt wird. Auch dieser Effekt ist bei der PFK-Reaktion zu beobachten, wenn F-6-P das varibale Substrat und ADP das Produkt ist.
Unsere Ergebnisse stimmen mit einem "ordered sequential"Mechanismus überein. Nur die kompetitive Hemmung von FDP gegenüber F-6-P durch Sättigung an ATP wird unkompetitiv. Da F-6-P und FDP um dieselbe Enzymform konkurrieren, müßte die Hemmung durch FDP in jedem Fall kompetitiv bleiben. Diese abweichenden Ergebnisse könnten auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen sein. Da die Hemmwirkung von FDP bei sättigenden Konzentrationen an ATP äußerst gering ist (s. Abb.24), könnte der Hemmtyp als nur scheinbar unkompetitv inter-

pretiert werden. Die geringe Hemmung ist darauf zurückzuführen, daß die Hemmkonstante von FDP ungefähr 5 mM, die K_m von F-6-P aber nur 0,077 mM ist, demnach hat F-6-P eine sehr viel höhere Affinität zum freien Enzym (E) als FDP. Um einen eindeutigen Effekt zu erhalten, müßte man die FDP-Konzentration gegenüber den in unserem Versuch benutzten (max.3,7 mM) sehr viel höher wählen. Hinzu kommt, daß der E-F-6-P-Komplex bei hoher ATP-Konzentration sehr viel schneller in den E-F-6-P-ATP-Komplex umgewandelt wird, und damit die Reaktion E + F-6-P $\rightleftharpoons$ E-F-6-P nach rechts verschoben wird.

Die Ergebnisse deuten auf einen "ordered sequential" Mechanismus der von der Leber-PFK katalysierten Reaktion hin. Hierbei wird als erstes Substrat F-6-P gebunden, dann MgATP. Als erstes Produkt verläßt MgADP den Komplex, dann als letztes FDP.

Ein "rapid equilibrium random"-Mechanismus wie ihn KEE et al. (1972) oder ein "sequential" Mechanismus mit MgATP als erstem Substrat, wie ihn UYEDA (1972) fordert, ist für das Leberenzym nicht möglich, da MgADP eindeutig nicht kompetitiv zu MgATP wirkt. Neueste Untersuchungen von COTTAM und UYEDA (1973) an Kaninchenmuskel-PFK haben haben einen quarternären Komplex (Enzym-Mg-ATP-F-6-P) mit Hilfe von Protonen-Relaxationsmessungen nachgewiesen, so daß ein Ping-Pong-Mechanismus auch für dieses Enzym ausgeschlossen werden kann.

3. Kapitel III:
Untersuchungen über die Wirkung von Effektoren, die einen aktivierenden oder inaktivierenden Einfluß auf die Phosphofruktokinasereaktion haben

3.1. Allgemeine Einführung

Im Hinblick auf mögliche Regulationen der Enzymaktivität durch Faktoren, die von physiologischer Relevanz sein könnten und in Anbetracht des Unterschieds zwischen Muskel- und Leberstoffwechsel sollen die Wirkungen PFK-aktivierender und -inaktivierender Substanzen überprüft werden. Es handelt sich um Gruppen von Substanzen, die sich wie folgt einordnen lassen: 1. PFK-hemmende, 2. PFK-aktivierende und 3. PFK-reaktivierende Effektoren.

Die auffälligste Eigenschaft der PFK ist ihre Hemmbarkeit durch ATP schon bei geringen Konzentrationen (LARDY et al.,1956). Als Endprodukt der Glykolyse ist ATP also ein "feed-back"-Inhibitor, der als allosterische Effektor direkt die PFK-Aktivität und der über steigende F-6-P-Konzentrationen und somit steigende G-6-P-Konzentrationen indirekt die Hexokinase-Aktivität hemmen kann. Die Glukokinase der Leber ist durch G-6-P nicht hemmbar, sodaß die Phosphorylierung der Glukose gewährleistet ist, auch wenn der glykolytische Substratfluß gehemmt ist.

Bei der in vivo vorliegenden Konzentration von etwa 2 - 3 mM ATP ist eine katalytische Aktivität der PFK nur zu erwarten, wenn entweder die obengenannte ATP-Konzentration, die eine Gesamtmessung der Zelle ist, an der cytosolischen Wirkungsstelle des Enzyms wesentlich niedriger ist, oder wenn die Hemmwirkung des ATP durch positive Effektoren vermindert wird.

Die ATP-Hemmung wird durch Citrat verstärkt. Mit Ausnahme des Enzyms aus menschlichen Erythrozyten (STAAL et al., 1972) ist eine Hemmung durch Citrat bei allen anderen Enzympräparationen gefunden worden (u.a. von GARLAND et al., 1963 am Herzmuskelenzym, PASSONNEAU und LOWRY, 1963 am Gehirnenzym und PARMEGGIANI und BOWMAN, 1963 am Muskelenzym). Ob dieser Effekt von regulatorischer Bedeutung ist, erscheint - zumindest für das Leberenzym - fraglich. Der Citratgehalt in der Rattenleber fällt nämlich unter Hungerbedingungen ab und steigt nicht an (GREENBAUM et al..1971 und

START und NEWSHOLME,1968), wie es bei einer Glykolyserate unter diesen Bedingungen von nahezu Null zu erwarten wäre, wenn die Hemmung durch Citrat einen entscheidenden Einfluß auf die Regulation der PFK und damit der Gesamtglykolyse hätte. Dagegen steigt die Citratkonzentration im Herzmuskel unter Hungerbedingungen beträchtlich an. Es ist jedoch zu beachten, daß die Mitochondrien dieses Gewebes kein Citratcarrier-System besitzen (SLUSE et al., 1971).Über die Verteilung des Citrats innerhalb der Zelle kann deshalb nichts Endgültiges ausgesagt werden.

Es bleibt zu klären, wie sehr die in der Leberzelle vorkommende Citratkonzentration von etwa 0,3 µMol/g Feuchtgewebe (GREENBAUM et al.,1971)die Hemmung des Leberenzyms durch ATP verstärken kann.

Eine signifikant reaktivierende Wirkung von AMP auf das durch ATP gehemmte Enzym wurde von PASSONEAU und LOWRY (1962) entdeckt. Die Autoren führten dies auf eine Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle zurück. Die Reaktivierung durch AMP scheint eine allgemeine Eigenschaft der PFK zu sein und wird auch für das Leberenzym beschrieben (KEMP, 1971).Die Veränderungen des ATP/AMP-Verhältnisses und die daraus resultierenden Veränderungen der Inaktivierung der PFK durch ATP und der Reaktivierung durch AMP wird als Hauptangriffspunkt der Regulation dieses Enzymes und der Gesamtglykolyse betrachtet (H.A.KREBS, 1972).Diese Interpreation entspricht dem "energy-charge"-Prinzip nach ATKINSON (1971).

Als zusätzliche positive Effektoren der PFK werden beschrieben: NH_4^+ (ABRAHAMS und YOUNATHAN,1970), ADP, Phosphat und FDP (PASSONNEAU und LOWRY, 1962). Die Wirksamkeit für das Leberenzym ist von KEMP (1971) im Vergleich zum Muskelenzym als weniger bedeutsam charakterisiert worden.

3.2. Methoden und Ergebnisse

3.2.1. Allgemeine Testbedingung

Es geht im folgenden um Untersuchungen zur Beeinflussung der PFK-Aktivität durch ATP, ADP und Citrat sowie die Beeinflussung der Effekte dieser Metabolite durch AMP, NH_4^+ und F-6-P.

Da es sich bei den Untersuchungen methodisch gesehen um Variationen desselben Grundansatzes handelt, erübrigt sich ein gesonderter Methodenbericht. Allgemeine Bedingung in allen Testserien - sofern nicht anders angegeben - ist der folgende Ansatz (es handelt sich um Endkonzentrationen):

50 mM Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 7,0
3,0 mM $MgCl_2$
5 mM Mercäptoäthanol
0,32 mM NADH, Reinheitsgrad 1
Hilfsenzyme: Aldolase 20 µg = 0,18 U,TIM
2 µg = 4,8 U, GDH 18 µg = 0,72 U

Die Hilfsenzyme werden durch Sephadex-G 25 - Filtration von $(NH_4)_2SO_4$ befreit. Peinlich genau muß auf die Einhaltung des pH-Wertes von 7,0 geachtet werden. Die PFK-Menge wird jeweils so gewählt, daß die Aktivität eine Extinktionsabnahme von 0,1/min nicht überschreitet.
Die Höhe der ATP- und F-6-P-Konzentrationen und die Zusätze können den jeweiligen Abbildungen entnommen werden.

3.2.2. ATP-Hemmung

(1.) Wir untersuchen die Abhängigkeit der PFK-Aktivität von der ATP-Konzentration. Wie aus Abb.27 ersichtlich ist, wirkt ATP bei hohen Konzentrationen auch auf das Leberenzym hemmend.

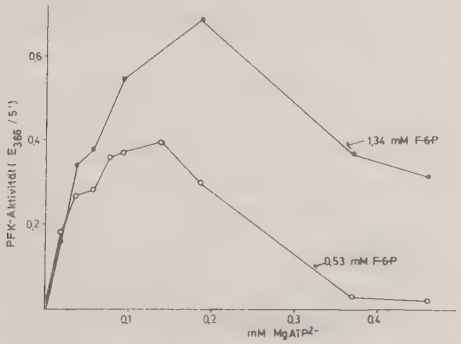


Abbildung 27:
Abhängigkeit der PFK-Aktivität von der ATP-Konzentration bei verschiedenen F-6-P-Konzentrationen

Die zur Hemmung notwendige ATP-Konzentration nimmt mit steigender F-6-P-Konzentration zu. Die ATP-Hemmung läßt sich sowohl durch Zugabe von AMP als auch durch Erhöhung des pH-Wertes rückgängig machen(hier nicht dargestellt).
(2.) Abhängig von der ATP-Konzentration ist auch die Art der F-6-P-Sättigungskinetik. Abbildung 28 demonstriert, daß die Sigmoidizität der Kurven durch die Erhöhung der ATP-Konzentration verstärkt wird. Der Zusatz von AMP bewirkt den Übergang zu einer Michaelis-Menten-Kinetik.

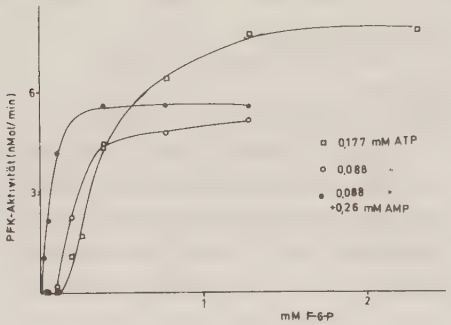


Abbildung 28:
Abhängigkeit der PFK-Aktivität von der F-6-P-Konzentration bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen mit und ohne AMP-Zusatz.

(3.) Die Aktivierung der PFK-Aktivität durch Ammoniumionen (vgl.Abbildung 29) wird unter der Fragestellung einer evtl. Beeinflussung der ATP-Hemmung untersucht.

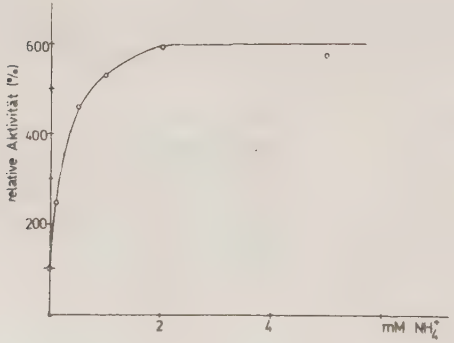


Abbildung 29:
Aktivierung der PFK durch Ammoniumionen.

Es zeigt sich, daß auch durch hohe Ammoniumsulfatkonzentrationen trotz einer Aktivierung der PFK die ATP-Hemmbarkeit des Enzyms

unbeeinflußt bleibt (vgl. Abbildung 30a).

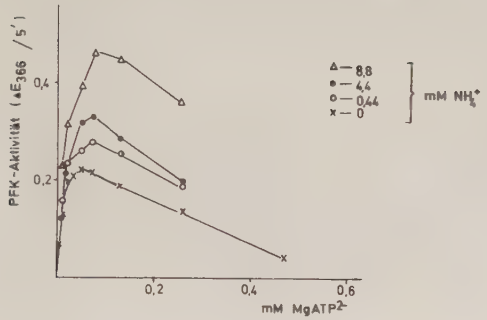


Abbildung 30a:

Wirkung von Ammoniumsulfat auf die Abhängigkeit der PFK-Aktivität von ATP.

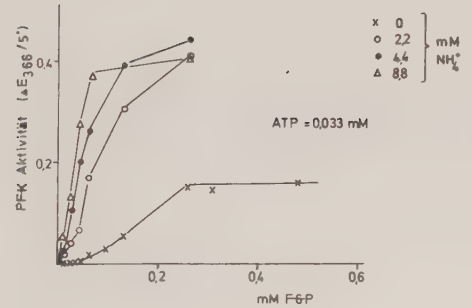


Abbildung 30b:

Wirkung von Ammoniumsulfat auf die Abhängigkeit der PFK-Aktivität von F-6-P.

Ansteigende Konzentrationen an Ammoniumsulfat bewirken eine abnehmende Tendenz der Sigmoidizität der F-6-P-Kinetik.

3.2.3. Hemmung durch ADP

(1.) ADP ist ein Endprodukt der Enzymreaktion und daher ist bei genügend hohen Konzentrationen eine Hemmung zu erwarten. In der Regel tritt eine Produkthemmung bei Konzentrationen auf, die physiologisch nicht von Bedeutung sind. Unsere Untersuchungen mit dem Leberenzym haben jedoch ergeben, daß schon bei annähernd 0,5 mM ADP eine 50-prozentige Hemmung sichtbar werden kann. Dies ist Anlaß zu weiteren Untersuchungen gewesen.

Abbildung 31 veranschaulicht, daß durch eine Erhöhung der F-6-P-Konzentration eine Veränderung des pH-Wertes von 7,0 auf 8,0 und Zugabe von steigenden Konzentrationen an AMP die Hemmung durch ADP so gut wie unbeeinflußt bleibt.

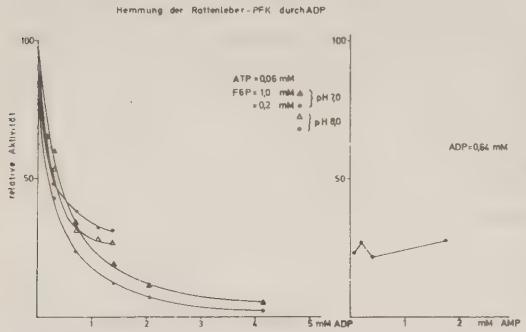


Abbildung 31:
Relative Hemmung der PFK durch ADP bei unterschiedlichen F-6-P-Konzentrationen und Einfluß von AMP und pH-Wert.

(2.) Die Auswirkung von unterschiedlich hohen ATP-Konzentrationen auf die Hemmung der PFK durch ADP wird in Abbildung 32 verdeutlicht.

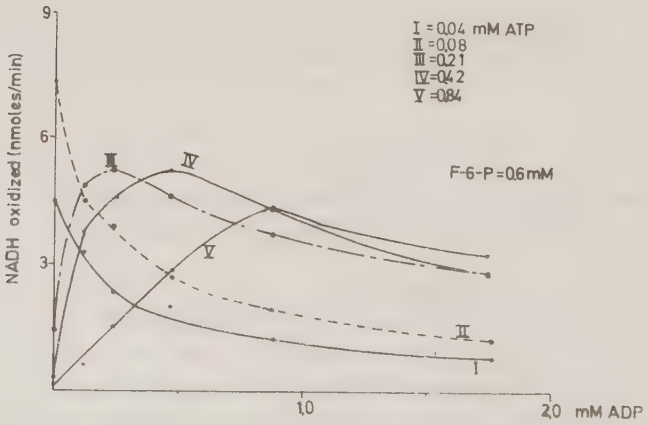


Abbildung 32: Auswirkungen verschieden hoher ATP-Konzentrationen auf die Beeinflussung der PFK-Aktivität durch ADP.

Bei nicht hemmenden Konzentrationen an ATP (I,II) bewirken jeweils 0,27 mM ADP eine 50%-ige PFK-Hemmung. Bei hemmenden Konzentrationen an ATP (III,IV,V) erweist sich ADP schon bei sehr niedrigen Konzentrationen als reaktivierend. Eine Hemmung durch ATP macht sich in allen 3 Fällen erst dann bemerkbar, wenn eine Reaktivierung bis zu etwa gleichhohen Aktivitäten erfolgt ist.

(3.) Von den von uns untersuchten Substanzen schwächt nur die Zugabe von Ammoniumionen die Hemmung der PFK-Aktivität durch ADP. Bei den verwendeten Konzentrationen von 0,3 mM und 0,61 mM Ammoniumchlorid vermindert sich der Hemmeffekt von ADP um 10 bzw.20% (hier nicht dargestellt).

(4.) Zwar sollte die Hemmung durch ADP auch an dem "nativen" Enzym aus Rattenleber und -skelettmuskel vergleichend durchgeführt werden, jedoch sind die Versuche nur mit vorgereinigten Enzymen durchführbar gewesen, da die Adenylatkinase entfernt werden muß. Die Enzymextrakte werden zu diesem Zweck identischen Reinigungsschritten unterzogen, die möglichst schonend sind (Ammoniumsulfatfällung und Sephadex -G 200-Säulenfiltration). Die sich anschließenden Bestimmungen der Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der ADP-Konzentration bei identischen Versuchsbedingungen ergeben, daß das Leberenzym durch eine Konzentration von 0,7 mM, das Muskelenzym jedoch erst durch 4 mM ADP zu 50% ghemmt wird (vgl.Abbildung 33).

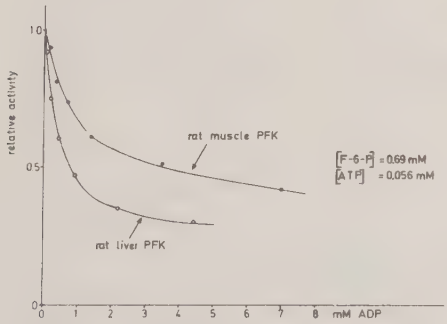


Abbildung 33:

Vergleich der Hemmwirkung von ADP auf nur vorgereinigte PFK-Präparationen aus Leber- und Muskelgewebe der Ratte.

3.2.4. Citrat-Hemmung

Die Ergebnisse, daß die Citrathemmung durch steigende Konzentration an ATP verstärkt wird (vgl.Abbildung 34), daß sie durch steigende F-6-P-Konzentrationen abgeschwächt wird (vgl.Abbildung 35), daß schließlich die Citrathemmung durch geringe Konzentrationen an AMP aufgehoben werden kann (vgl. Abbildung 36), führten zu der Frage: Unter welchen Bedingungen hat Citrat bei Anwesenheit von physiologisch vorkommenden Konzentrationen an AMP noch einen hemmenden Effekt auf die PFK-Aktivität?

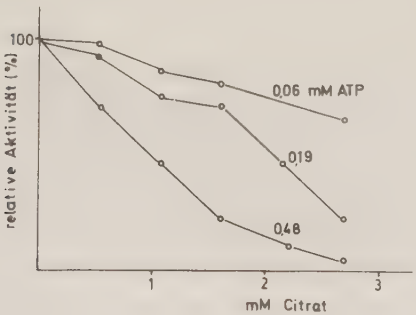


Abbildung 34:
Citrat-Hemmung der PFK bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen.

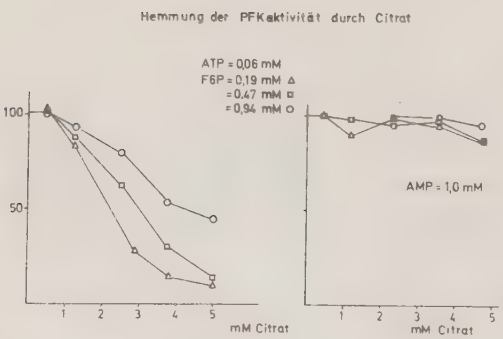


Abbildung 35:
PFK-Hemmung durch Citrat bei unterschiedlichen F-6-P-Konzentrationen und Beeinflussung der Hemmung durch AMP.

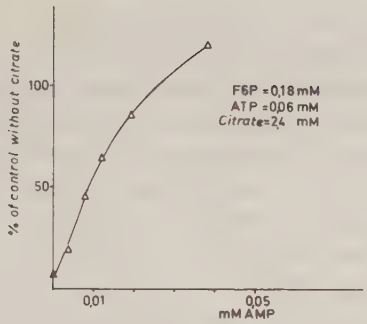


Abbildung 36:
Reaktivierung der durch Citrat gehemmten PFK durch AMP.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, wie wirksam die Hemmung des Enzyms durch Citrat ist in Gegenwart physiologischer Konzentrationen an ATP, AMP und F-6-P, werden die in Abbildung 37 wiedergegebenen Versuche durchgeführt. Die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der PFK-Reaktion von der F-6-P-Konzentration ist gemessen worden in Gegenwart von jeweils 0,32 mM AMP und 3 unterschiedlichen Citratkonzentrationen. Diese Bedingungen sind jeweils in 3 Meßserien mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen wiederholt worden. Die ATP-Konzentrationen sind:

Serie I: 0,10 mM ATP
Serie II: 0,48 mM ATP
Serie III: 0,94 mM ATP

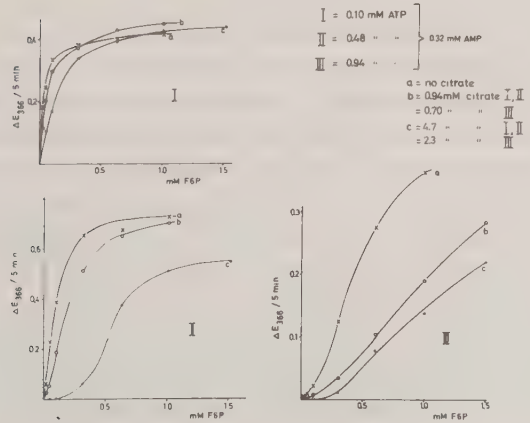


Abbildung 37:
Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der PFK-Reaktion von F-6-P bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen und An- oder Abwesenheit von Citrat. Die AMP-Konzentration ist jeweils 0,32 mM.

Es läßt sich beobachten, daß Citrat auch bei Anwesenheit von 0,32 mM AMP einen beachtlichen von der ATP-Konzentration abhängigen Hemmeffekt auf das Enzym ausübt. Dadurch wird zwar die Maximalgeschwindigkeit nicht beeinflußt (vgl.Abbildung 38), jedoch wird die Sigmoidizität der Kinetiken ausgeprägter. Das bedeutet, daß das Enzym in Gegenwart von ausreichend hohen Citratkonzentrationen auf Veränderungen der F-6-P-Konzentration im physiologischen Bereich von ungefähr 10 µM wesentlich weniger sensitiv reagiert als bei niedrigen Citratspiegeln.

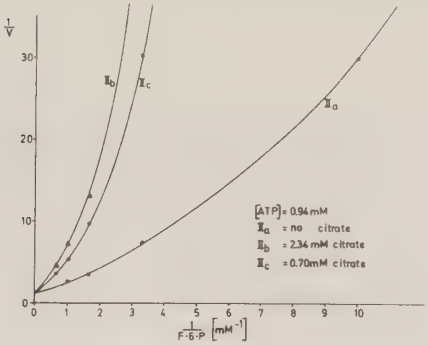


Abbildung 38:

Doppelt reziproke Auftragung der in Abbildung 37/III dargestellten Versuchsserie.

3.3. Ansätze zur Bestimmung regulatorischer Bindungsstellen

3.3.1. Fragestellung

Bei Untersuchungen zur Differenzierung der PFK-Isoenzyme aus Leber- und Muskelgewebe der Ratte haben wir beobachtet, daß das katalytische Zentrum durch die Bindung des Kaninchenantikörpers am Leberenzym nicht beeinflußt wird (vgl.Abbildung 39). Dies hat uns veranlaßt, nachzuforschen, ob die für die Hemmung durch ATP verantwortliche regulatorische Bindungsstelle in dem PFK-Antikörper-Komplex noch zugänglich ist und eine für ein allosterisches Verhalten geforderte Konformationsänderung möglich ist. Wären beide Voraussetzungen gegeben, könnte erwartet werden, daß auch der Enzym-Antikörper-Komplex eine Hemmbarkeit durch ATP aufweist. Im anderen Fall müßte für die Hemmung durch ADP und Citrat entschieden werden können, ob diese möglicherweise durch eine Beeinflussung der regulatorischen Bindungsstelle hervorgerufen wird.

3.3.2. Methoden

3.3.2.1. Allgemeine Testbedingungen

Eine definierte Menge an Enzym wird bei 25°C mit dem Antikörper (vgl. hierzu Erzeugung, Vorreinigung und Nachweis von PFK-Antikörper im Anhang, Methoden) in EPPENDORF-Inkubationsgefäßen- ggf. mit Zusätzen - inkubiert. Für die Kontrollversuche benutzen wir eine Immunglobulin(IgG)-Fraktion des Versuchskaninchens, die diesem vor der Immunisierung mit Rattenleber-PFK entnommen worden ist. In dem Inkubationsansatz wird nach Beendigung des Versuchs die PFK-Aktivität bestimmt. Die Messung wird entweder direkt mit dem Inkubationsansatz oder mit dem Überstand des Inkubationsansatzes durchgeführt. Zu dem Überstand gelangt man durch eine 2 Minuten lang dauernde Zentrifugation des Inkubationsansatzes in einer EPPENDORF-Zentrifuge. Falls nicht anders angegeben, wird die PFK-Aktivität unter optimalen Bedingungen getestet (vgl. hierzu die PFK-Aktivitätsbestimmung im Anhang,Methoden).

3.3.2.2. Spezielle Testbedingungen

Versuch I : Das Ziel dieses Versuchs ist die Bestimmung der PFK-Antikörper-Komplexbildung und der Nachweis der katalytischen Aktivität dieses Komplexes.
Jeweils 10 µl PFK -gelöst in 20 mM K-PO_4-Puffer, pH 7,6 ; 5 mM an Mercaptoäthanol und 3 mM an $MgCl_2$ - mit einer spezifischen Aktivität von 21,4 U/mg Protein werden mit zunehmenden Mengen von Antikörperserum in 0,9 %-iger NaCl inkubiert. Das Endvolumen von 50 µl wird durch Zugabe von 0,9 %-iger NaCl erreicht. Der Versuch wird bei 25°C durchgeführt. Nach 10 Minuten dauernder Inkubierung werden 20 µl des Inkubats für eine PFK-Aktivitätsbestimmung entnommen. Der Rest des Inkubats wird zentrifugiert und der resultierende Überstand ebenfalls auf PFK-Aktivität überprüft.

Versuch II soll klären, ob die PFK im Antikörper-Komplex noch durch ATP hemmbar ist.
Zu diesem Zweck werden PFK und Antikörper in einem solchen Verhältnis 15 Minuten lang bei 25°C inkubiert,daß noch ca. 10% der Ausgangsaktivität an PFK nach einer Zentrifugation im Überstand zu finden ist. Diese so im Vorversuch bestimmte Mischung von PFK und Antikörper wird wie oben inkubiert und ohne vorherige Zentri-

fugation für eine ATP-Kinetik verwendet. Dabei wird die ATP-Konzentration von 0,02 mM bis 0,9 mM variiert. Die F-6-P-Konzentration beträgt 0,46 mM. Die übrigen Testbedingungen entsprechen denen, die unter Punkt 3.2.1. beschrieben sind. Die Vergleichskinetik wird mit einem PFK-Nullserum-Inkubat durchgeführt.

Versuch III dient dem Ziel, die Wirkung von ADP auf die im Antikörper-Komplex gebundene PFK zu prüfen.
Wir verwenden ein PFK-Antikörper-Inkubat, welches nach zweiminütiger Zentrifugation im Überstand noch 5% der PFK-Ausgangsaktivität besitzt. Mit einem solchen Inkubat, welches allerdings nicht zentrifugiert wird, testen wir die Abhängigkeit der Aktivität der im Antikörper-Komplex gebundenen PFK von ADP-Konzentrationen. Der Testansatz enthält als spezifische Bedingungen 0,09 mM ATP, 0,59 mM F-6-P und 0,30 mM AMP als Endkonzentrationen. Die ADP-Konzentration variiert dabei von o bis 1,14 mM. Unter gleichen Bedingungen wird ein Kontrollversuch mit Nullserum statt Antikörperserum durchgeführt.

Versuch IV prüft die Wirkung von ATP, AMP, F-6-P und Citrat auf die PFK-Antikörper-Komplexbildung.
Folgende Inkubationen liegen zugrunde:

1. Das Enzym wird mit dem Antikörper 8 Minuten lang inkubiert und nach einer anschließenden 2-minütigen Zentrifugation die PFK-Aktivität im Überstand bestimmt.
2. Das Enzym wird in Gegenwart einer oder mehrerer oben genannter Substanzen (ATP,AMP,F-6-P,Citrat) wie unter 1. beschrieben inkubiert.
3. Das Enzym wird 4 Minuten mit dem Antikörper inkubiert, dann die Substanz zugegeben. Nach weiteren 4 Minuten wird die Inkubation durch die Zentrifugation beendet.
4. Das Enzym wird mit der Substanz 4 Minuten inkubiert, dann der Antikörper zugegeben.

Die Inkubationen aller Versuchsserien erfolgen in 50 mM Triäthanol-HCl-Puffer, pH7,0 ,der 3 mM an $MgCl_2$ und 5 mM an Mercaptoäthanol enthält. Zu jeder Versuchsserie wird eine Kontrolle mit Nullserum anstelle Antikörperserum durchgeführt. Die Versuchstemperatur ist in allen Fällen 25°C .

3.3.3. Ergebnisse III

3.3.3.1. Katalytische PFK-Aktivität des PFK-Antikörperkomplexes

Die katalytische Aktivität der PFK geht durch die Bildung eines Komplexes mit dem Antikörper nicht verloren (vgl.Tab.6). Der PFK-Antikörperkomplex sedimentiert bei der Zentrifugation. Dadurch kann nachgewiesen werden, daß die Aktivität, die vor der Zentrifugation gemessen wird, sich zusammensetzt aus der katalytischen Aktivität der nicht komplex-gebundenen PFK (das ist die Aktivität, die nach der Zentrifugation noch im Überstand zu finden ist) und der katalytischen Aktivität der an den Komplex gebundenen PFK, die nach der Zentrifugation im Überstand nicht mehr nachweisbar ist.

Tabelle 6:

Bestimmungen der PFK-Aktivität nach Inkubation des Enzyms mit einem spezifischen Antikörper.

Menge des Antikörpers gemessen in µl		0	10	20	30	40
Aktivität (ΔE_{366}/5min.)	vor der Zentrifugation	0,448	0,435	0,360	0,385	0,430
	nach der Zentrifugation	0,410	0,400	0,284	0,190	0,090

(vgl. weitere Angaben zu diesem Versuch unter 3.3.2.2.,I).

3.3.3.2. ATP-Kinetik mit dem PFK-Antikörperkomplex

Die Hemmbarkeit der PFK durch ATP wird durch die Bildung des PFK-Antikörperkomplexes so gut wie vollständig aufgehoben. Wie aus Abbildung 39 hervorgeht, bewirkt erst die Konzentration von ca. 1 mM eine erkennbare Hemmung. Es ist zudem nicht ausgeschlossen, daß diese auftretende Hemmung auf einen Teil der freien PFK zurückzuführen ist, der durch die Anwesenheit von 1 mM ATP entsteht (vgl.Abb.41). Der Kontrollversuch beweist, daß die Aufhebung der Hemmbarkeit durch ATP nicht auf eine unspezifische Wirkung von Immunglobulinen zurückzuführen ist.

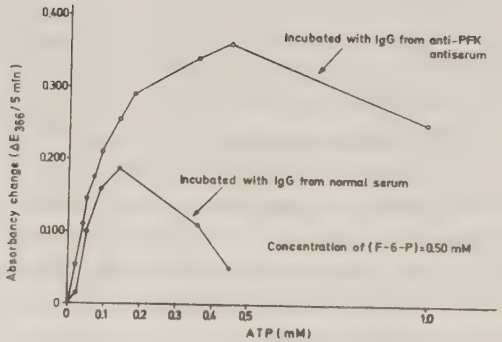


Abbildung 39: Hemmbarkeit der im PFK-Antikörper gebundenen PFK durch ATP. (Vgl.weitere Bedingungen unter 3.3.2.2.,II)

3.3.3.3. Die Hemmbarkeit der enzymatischen Reaktion durch ADP

Die Bindung des Enzyms an den PFK-Antikörper beeinflußt die Hemmbarkeit der PFK-Aktivität durch ADP nicht. Eine 50%-ige Hemmung der katalytischen Aktivität wird sowohl bei dem PFK-Antikörper als auch beim Kontrollversuch mit Nullserum durch eine ADP-Konzentration von 0,57 mM hervorgerufen (vgl.Abbildung 40).

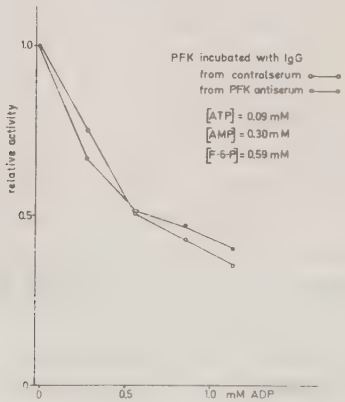


Abbildung 40:
Hemmung der PFK-Aktivität im PFK-Antikörperkomplex durch ADP (vgl.weitere Versuchsbedingungen unter 3.3.2.2.,III).

3.3.3.4. Wirkung von ATP,AMP,F-6-P und Citrat auf die PFK-Antikörper-Komplexbildung

Da die im Antikörperkomplex gebundene PFK keine Hemmbarkeit durch ATP aufweist, vermuten wir, daß die regulatorische Bindungsstelle für ATP an der Bindung des Antikörpers an dem Enzym beteiligt ist. Wir versuchen, die Enzym-Antikörperkomplexbildung durch Substanzen zu beeinflussen, die wahrscheinlich auf diese Bindungsstelle für ATP einen Einfluß ausüben. Als Substrate, die mit dem Antikörperkomplex konkurrieren, werden ATP,AMP,F-6-P und Citrat eingesetzt. Es zeigt sich, daß eine Vorinkubation des Enzyms mit ATP die Bildung des PFK-Antikörperkomplexes teilweise verhindert. Dieser Effekt des ATP wird durch AMP verstärkt, während AMP allein kaum eine Verdrängung bewirkt (vgl. Abbildung 41).

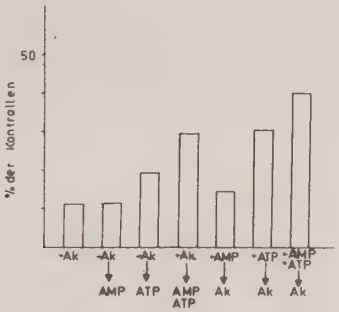


Abbildung 41: Auswirkung von ATP und AMP auf die PFK-Antikörper-Komplexbildung. Die Endkonzentrationen des Inkubationsansatzes an AMP und ATP sind jeweils 1 mM (vgl. weitere Versuchsbedingungen unter 3.3.2.2.,IV).

ATP und AMP sind am effektivsten für eine Verhinderung der PFK-Antikörper-Komplexbildung, wenn sie mit dem Enzym inkubiert werden, bevor der Antikörper zugesetzt wird.

Vorinkubation des Enzyms mit Citrat hemmt eindeutig die PFK-Antikörper-Komplexbildung. Dagegen ist Citrat nicht in der Lage, den Antikörper aus der Bindung mit PFK zu verdrängen.

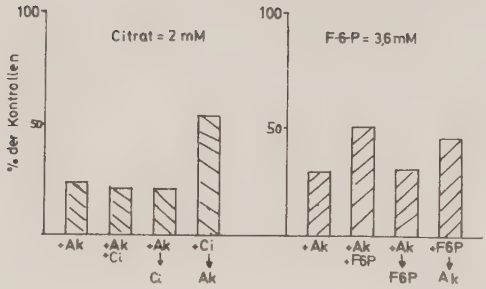


Abbildung 42: Einfluß von Citrat und F-6-P auf die Antikörperbildung. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den Inkubationsansatz (vgl. weitere Versuchsbedingungen unter 3.3.2.2.,V).

3.4. Diskussion

3.4.1. Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der allosterischen Eigenschaften durch Effektoren

Wie Daten aus unseren Versuchsreihen belegen, weist die Phosphofruktokinase aus Rattenleber eine ausgeprägte Hemmbarkeit durch ATP auf. Die relative Hemmbarkeit ist deutlich abhängig von der F-6-P-Konzentration, und zwar wirken Erhöhungen der F-6-P-Konzentration der Hemmung entgegen. Die Zugabe von AMP und die Erhöhung des pH-Wertes vermindern die Hemmwirkung des ATP. Die Sigmoidizität der F-6-P-Sättigungskinetik wird durch steigende ATP-Konzentrationen verstärkt. In der Leber werden als maximale F-6-P-Konzentrationen ca. 60 nMol/g Feuchtgewebe (GREENBAUM et al., 1971) gefunden. Während einer Hungerperiode von 12-24 Stunden sinkt diese Konzentration auf 6-15 nMol/g Feuchtgewebe (SÖLING und PETERS,1973). Diese beachtlichen Konzentrationsschwankungen sind sicherlich für die PFK-Aktivität von großer Bedeutung, da diese Konzentrationen weit unter der halbmaximalen Substratsättigung liegen. Bei pH 8,0, physiologischer Konzentration an AMP aber nur 0,9 mM ATP liegt der $S_{0,5}$-Wert immerhin etwa 1 mM F-6-P (vgl. Abb.38).

Ammoniumionen wirken steigernd auf die katalytische Aktivität der PFK, doch bleibt die ATP-Hemmbarkeit unbeeinflußt.Die Sigmoidizität der F-6-P-Sättigungskinetik des Enzyms wird abgeschwächt in Abhängigkeit von der NH_4^+ - Konzentration. Dies bedeutet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der PFK für geringe Konzentrationsverschiebungen im Bereich weit unterhalb der halbmaximalen Sättigung in Gegenwart von Ammoniumionen empfindlicher wird (vgl.Abb.30b). Da die Ammoniumionen-Konzentration im Leber-, im Unterschied zum Muskelgewebe, auch bei physiologischen Veränderungen, die die Glykolyserate beeinflussen, nahezu konstant bleibt, kann dieses Kation für die PFK kaum von regulatorischer Bedeutung sein. Die Ammoniumionenkonzentration, auch wenn sie konstant bleibt, trägt dazu bei, die katalytische Fähigkeit des Enzyms zu steigern.

ADP hat einerseits einen hemmenden, andererseits einen reaktivierenden Einfluß auf die PFK. Schon bei Konzentrationen um

0,2 - 0,3 mM vermag ADP die nicht durch ATP inhibierte PFK um 50% zu hemmen (vgl.Abb.31). Diese Hemmwirkung ist unbeeinflußbar durch AMP und Erhöhung des pH-Wertes. Ist das Enzym jedoch durch ATP gehemmt,wirkt ADP reaktivierend (vgl.Abb.32). Dieser Effekt könnte von physiologischer Bedeutung sein, da die zur Reaktivierung notwendige ADP-Konzentration unter der in der Zelle gefundenen liegt (ca. 1 µMol/g Feuchtgewebe nach GREENBAUM et al., 1971).

Citrat hat auf das Leberenzym wie beim Muskelenzym eine zum ATP synergistische Hemmwirkung. Der Hemmeffekt wird durch steigende Konzentrationen an F-6-P und AMP vermindert. Unseren Versuchsergebnissen ist zu entnehmen (vgl.Abb.37), daß in Gegenwart physiologischer ATP-Konzentrationen die in der Zelle zu findende AMP-Konzentration nicht ausreicht, die Hemmung völlig aufzuheben, die durch die in der Leber gefundene Citratkonzentration (0,3 µMol/g Feuchtgewebe nach GREENBAUM et al.,1971) hervorgerufen werden kann. Da sich jedoch in der Leber die Citratkonzentration gleichsinnig mit dem Glykolysefluß verändert, kann der Einfluß von Citrat auf die PFK für die Glykolyse nicht von regulatorischer Bedeutung sein.

Da eine Vielzahl von Effektoren auf die PFK einwirken und deren Effektivität stark von den vorliegenden Bedingungen abhängig ist - im Falle von ADP sogar von einer Hemmwirkung in eine Aktivierung umschlagen kann - , ist zwar die Beschreibung der Eigenschaften jedes einzelnen Effektors möglich, aber eine Aussage darüber, wie wirksam der jeweilige Effekt in vivo ist, kann gegenwärtig noch nicht erfolgen. Hier sollen Simulationsversuche weiterhelfen.

Da hierbei jedoch die Lokalisation des Proteins in der Zelle in Bezug auf benachbarte Enzyme und H^+-Konzentrationen eine nicht kontrollierbare Variable bleibt, sind die Ergebnisse mit in vivo Verhältnissen nur bedingt vergleichbar.

3.4.2. Diskussion der Versuchsergebnisse zur Bestimmung regulatorischer Bindungsstellen an der PFK

Aus den Ergebnissen der Versuche mit dem PFK-Anti-PFK-IgG-Komplex ist zu schließen, daß durch die Komplexbildung das Enzym derart gebunden wird, daß entweder die regulatorische Bindungsstelle für ATP nicht mehr zugänglich oder ein Konformationswechsel der PFK im Komplex nicht mehr möglich ist.

Da eine Vorinkubation des Enzyms mit ATP die Komplexbildung herabsetzen kann, ist eine direkte oder indirekte Beteiligung der regulatorischen ATP-Bindungsstelle an dem PFK-Antikörper-Komplex wahrscheinlicher. Eine Vorinkubation des Enzyms mit AMP hat keine nennenswerte Auswirkung auf die Komplexbildung. Theoretisch könnte der Effekt dadurch hervorgerufen werden, daß die Affinität des Antikörpers zu dieser Bindungsstelle sehr viel größer ist als die des AMP. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Affinitäten der beiden Adeninnucleotide, AMP und ATP, zu ihren regulatorischen Bindungsstellen zumindest gleich groß sind. Da aber ATP eine Komplexbildung verhindern kann, kann gefolgert werden, daß die regulatorischen Bindungsstellen für ATP und AMP nicht identisch sind.

Wir konnten zeigen, daß durch Zusatz von Citrat die Bindung des Antikörpers an die PFK nicht rückgängig gemacht werden kann, durch Vorinkubation des Enzyms mit Citrat jedoch herabgesetzt ist. Diese Versuchsergebnisse lassen die Interpretation zu, daß die Komplexbildung die Bindungsstelle für Citrat unzugänglich macht und daß die Affinität des Antikörpers zur PFK durch eine Citrat-Bindung an das Enzym herabgesetzt wird. Die Hemmbarkeit der PFK in dem Antikörper-Komplex weist mit ziemlicher Sicherheit darauf hin, daß die Hemmbarkeit des freien Enzyms durch ADP eine echte Endprodukthemmung ist. Die Tatsache, daß die PFK, am Antikörper gebunden, katalytisch aktiv bleibt, jedoch keine ATP-Hemmbarkeit mehr ausweist, eröffnet die Möglichkeit zu weiteren Studien über regulatorische Bindungsstellen an dem Enzym.

4. Kapitel IV: Untersuchungen zur Frage der Interkonvertierbarkeit von Phosphofruktokinase aus Leber

4.1. Fragestellung

1964 veröffentlichten VINUELA et al. die erste Untersuchung über zwei interkonvertierbare Formen der Hefe-PFK. Durch Zusatz von Mg^{2+}, ATP, NaF und 3',5'-AMP zu einem Heferohextrakt beobachteten sie, daß die vorher ATP hemmbare PFK-Form in eine nicht mehr ATP-hemmbare PFK-Form überging. Sie vermuteten die Anwesenheit einer F^--hemmbaren Phosphatase, die in der Lage wäre, die PFK durch Dephosphorylierung von einer ATP-nichthemmbaren in eine hemmbare Form umzuwandeln.
ATZPODIEN et al. (1970) glaubten, einen Proteinfaktor angereichert zu haben, mit der Fähigkeit, eine solche Interkonvertierung - in Gegenwart von $MgATP^{2-}$ und F^- und einem hitzedenaturierten Hefeextrakt - zu katalysieren. Spätere Veröffentlichungen (AFTING et al., 1972) dieser Arbeitsgruppe berichten von einer proteinunabhängigen Interkonvertierung durch ein Inkubationsmedium von ADP, F-6-P, NH_4^+ und NaF. Der Proteinfaktor ihrer früheren Untersuchungen hatte nur die Umwandlung des bei diesen Versuchen zugesetzten ATP in ADP bewirkt. Es hat sich herausgestellt, daß für die Interkonvertierung ADP essentiell ist, während ATP (0,1 mM) diesen Vorgang hemmt. Der F^--Einfluß wird von ihnen auf die Komplexbildung mit Enzym-gebundenem Mg^{2+} zurückgeführt.

Wir haben beobachtet, daß F^- im Homogenisationsmedium eine Steigerung der spezifischen Aktivität der Rattenleber-PFK bewirkt. Dieser Effekt läßt die Arbeitshypothese zu, daß evtl. eine Phosphorylierung der PFK die katalytische Aktivität beeinflußt. Wenn es eine Phosphorylierung und Dephosphorylierung der PFK durch Zellproteine mit einer gleichzeitigen Aktivierung und Inaktivierung gibt, wäre dies eine weitere Möglichkeit zur Regulation der PFK-Aktivität.

4.2. Methoden

Die Versuche gehen im einzelnen folgenden Fragestellungen nach: Es soll geklärt werden, (1.) ob ein anderer Phosphatasehemmer und cyclisches AMP einen ähnlichen Effekt hervorrufen wie Fluorid; (2.) unter welchen Bedingungen der Fluorid-Effekt wirksam ist, nämlich a) ob er Phosphat-abhängig ist, b) ob er pH-abhängig ist, c) ob er abhängig von ernährungsbezogener Vorbehandlung ist, d) ob er abhängig ist von niedermolekularen Fraktionen. (3.) Es soll versucht werden, die den Fluorid-Effekt hervorrufenden Proteinfraktionen oder andere Faktoren anzureichern.

4.2.1. Versuche zur Klärung des Einflusses von F^-, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und cyclischem AMP auf die PFK-Aktivität

Die Leber einer mit Standardkost (Altromin-R) gefütterten Ratte wird mit 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 7,4 der 1 mM Dithiothreitol und 3 mM $MgSO_4$ enthält homogenisiert (1:5) und anschließend 60 min. bei 100.000 g zentrifugiert. Dieser Überstand (S_3) wird inkubiert mit und ohne NaF (1 mM), cycl. AMP (1 mM), NaF + cycl. AMP, PMSF 0,5 mM, PMSF + cycl. AMP.
Die Inkubationen werden bei 25°C durchgeführt. Die Aktivität wird zur Zeit t = 0' und t = 105' unter optimalen PFK-Testbedingungen (vgl. Anhang, Methoden) bestimmt.

4.2.2. Versuche zur Klärung der Abhängigkeit der Aktivierbarkeit der PFK durch Fluorid von verschiedenen Faktoren

4.2.2.1. Abhängigkeit der Fluoridaktivierung von Phosphat:

Das Homogenisationsmedium ist in diesem Fall Tris-HCl 20 mM, $MgSO_4$ 5 mM, Dithiothreitol 0,5 mM, Mercaptoäthanol 2,0 mM, pH 7,6. Die sonstigen Bedingungen zur Herstellung des S_3-Überstandes ist wie unter 4.2.1. beschrieben.
Inkubiert wird diese S_3-Fraktion mit und ohne Fluorid (2 mM), oder K-Phosphat (5 mM), oder Fluorid 2 mM + K-Phosphat(5 mM) .
Für die PFK-Aktivitätsbestimmung werden zur Zeit t = 0', 60' und 180' Proben entnommen.

4.2.2.2. pH-Abhängigkeit der F^--Aktivierung

Die Leber einer gefütterten Ratte wird halbiert, die Hälfte jeweils mit 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 6,95 bzw. 8,2, 3 mM an $MgSO_4$ und 5 mM an Mercaptoäthanol (1:10) homogenisiert und 60' bei 100.000 g zentrifugiert.
Die beiden S_3-Überstände werden mit und ohne NaF (5 mM) bei 25°C inkubiert. Es werden Aktivitätsbestimmungen nach 0' und 210' durchgeführt.

4.2.2.3. Abhängigkeit der Aktivierung durch Fluorid von dem Ernährungszustand der Versuchstiere

Für diese Versuchsserien werden die Lebern von einer mit Standardkost gefütterten Ratte und von Ratten, die Hungerbedingungen ausgesetzt waren, benutzt. Die Hungerperioden sind 24 Stunden, oder 48 Stunden, oder 72 Stunden lang gewesen. Das Lebermaterial wird, wie unter 4.2.1. beschrieben, homogenisiert und zentrifugiert. Die Inkubationen werden jeweils mit und ohne F^- (1 mM Endkonzentration) durchgeführt.

4.2.2.4. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aktivierung durch Fluorid von niedermolekularen Faktoren

Von mit Standardkost gefütterten und von 48 Stunden gefasteten Ratten wird, wie unter 4.2.1. beschrieben ist, der jeweilige S_3-Leberüberstand gewonnen. Jeweils ein Teil der S_3-Überstände wird durch Sephadex-G 25 Säulenfiltration von dem niedermolekularen Anteil (Ausschlußgrenze des Gels sind Molekulargewichte über 2.500) abgetrennt, während der andere Teil der S_3-Überstände ultrafiltriert wird. Hierzu wird in einer Druckapparatur mit einem Ultrafilter (SARTORIUS SM 12136) der niedermolekulare Anteil ohne Verdünnung unter N_2-Druck (3 atü) innerhalb von 1 Stunde von größeren Proteinen abgetrennt. Ausschlußgrenze des Filters ist in diesem Fall ein Molekulargewicht größer als 10.000. Die gelfiltrierten Proteinfraktionen werden jeweils mit beiden Ultrafiltraten (f und h), mit und ohne Fluorid, mit ATP, G-6-P und F-6-P, mit und ohne Fluorid, inkubiert. Der Übersichtlichkeit wegen werden die Inkubationsansätze tabellarisch angegeben (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenfassende Darstellung der durchgeführten Inkubationen des Versuchs 4.2.2.4.

Inkubation	S_3(f)	S_3(h)	Ultrafiltrat (f)	Ultrafiltrat (h)	F^-	ATP	GTP
1	+						
2	+				+		
3	+		+				
4	+		+		+		
5	+			+			
6	+			+	+		
7	+		+		+	+	
8	+		+		+		+
9	+			+	+	+	
10	+			+	+		+
11		+					
12		+			+		
13		+	+				
14		+	+		+		
15		+		+			
16		+		+	+		
17		+	+		+	+	
18		+	+		+		+
19		+		+	+	+	
20		+		+	+		+

4.2.3. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aktivierung durch Fluorid von Proteinfaktoren

Bei diesem Versuch fraktioniert man den S_3-Überstand, der, wie unter 4.2.1. beschrieben ist, gewonnen wird, mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung in den Bereichen: 0 - 25 %, 25 - 33 %, 33 - 40%, 40 - 50 % und 50 - 60% Sättigung. Die Niederschläge werden jeweils in 2 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 7,2, der 3 mM $MgSO_4$ und 5 mM Mercaptoäthanol enthält, aufgenommen. 0, 1 ml der 30 - 40 %-igen Ammonsulfatfraktion wird mit und ohne F^- (0,46 mM Endkonzentration), bei gleichzeitigem Zusatz von

ATP (0,46 mM Endkonzentration) und je einer der Ammoniumsulfatfraktionen (0,1 ml) inkubiert. Das Endvolumen ist jeweils 0,22 ml.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Einfluß von F^-, PMSF und cycl.AMP auf die PFK-Aktivität

Der, wie unter 4.2.1. beschrieben, durchgeführte Versuch ergibt (Tabelle 8), daß außer NaF auch PMSF einen, wenn auch geringeren, -ktivierenden Einfluß ausübt, während die Zugabe von cycl.AMP ohne Auswirkung bleibt.

Tabelle 8 : Einfluß von F^-, PMSF und cycl.AMP auf die PFK-Aktivität im S_3-Überstand. Die Inkubationen sind mit S_3-Überstand in Phosphatpuffer bei 25° C durchgeführt worden. Nach Beendigung der angegebenen Versuchsdauer wird ein Anteil des Inkubationsansatzes entnommen und unter optimalen Bedingungen auf PFK-Aktivität hin untersucht (vgl.weitere Bedingungen unter 4.2.1.1.).

Inkubationsansatz	PFK-Aktivität (ΔE_{366}/min)	
	t = 0'	t = 105'
S_3	0,252	0,252
S_3 + NaF (1 mM)	0,252	0,504
S_3 + cycl.AMP(1mM)	0,252	0,212
S_3 + NaF + cycl.AMP	0,252	0,498
S_3 + PMSF (0,5 mM)	0,252	0,384
S_3 + PMSF + cycl.AMP	0,252	0,342

4.3.2. Abhängigkeit der Aktivierung der PFK durch F^- von verschiedenen Faktoren

4.3.2.1. Abhängigkeit der Aktivierung der PFK durch F^- von Phosphat

Die Aktivierung der PFK durch Fluorid im S_3-Überstand ist von der Anwesenheit von Phosphat-Ionen abhängig. Die im Vergleich zum Vorversuch 4.3.1. geringere Aktivierung (nur 50%) ist darauf zurückzuführen, daß der pH-Wert in diesem Inkubationsansatz nur 7,15 beträgt (s.auch unten 4.3.2.2.).

Tabelle 9: Abhängigkeit der Aktivierung der PFK durch F^- von der Anwesenheit von Phosphat. Die Endkonzentrationen von F^- und Phosphat betragen 2 mM bzw. 5 mM. Jeweils ein Aliquot des Inkubationsansatzes wird unter optimalen Bedingungen auf PFK-Aktivität getestet.Weitere Versuchsbedingungen sind unter 4.2.2.1. angegeben.

Inkubationsbedingung	PFK-Aktivität		
	t = 0'	t = 60'	t = 180'
		(ΔE_{366}/5min)	
Tris-S_3	0,250	0,245	0,255
Tris-S_3 + F^-	0,248	0,280	0,304
Tris-S_3 + P_i	0,265	0,255	0,255
Tris-S_3 + P_i + F^-	0,253	0,330	0,360

4.3.2.2. pH-Abhängigkeit der PFK-Aktivierung durch Fluorid

Die Steigerung der PFK-Aktivität im S_3-Überstand ist eindeutig von dem pH-Wert des Inkubationsmediums abhängig. Während die F^--abhängige Aktivierung bei pH 6,95 immerhin noch 35 % beträgt, ist bei pH 8,2 keinerlei Aktivierung erkennbar. Da die PFK-Aktivitätszunahme bei pH 7,4 (s.Tabelle 8) sogar 100% erreicht, ist anzunehmen, daß das pH-Optimum der Aktivierbarkeit durch Fluorid zwischen 6,95 und 8,2 liegen wird. Die pH-Abhängigkeit der Aktivierung durch Fluorid ist in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10: Abhängigkeit der PFK-Aktivierung durch F^- von den pH-Bedingungen. Die Leber einer gefütterten Ratte wird in Phosphatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten homogenisiert und der S_3-Überstand, wie unter 4.2.1. beschrieben, hergestellt. Diese Überstände werden mit und ohne Fluorid inkubiert. Aliquots der Inkubationsansätze werden nach den angegebenen Inkubationszeiten entnommen und unter optimalen Bedingungen auf PFK-Aktivität getestet (vgl. weitere Versuchsbedingungen unter 4.2.2.2.).

Inkubation	PFK-Aktivität	
	t = 0'	t = 200'
	(ΔE_{366}/5 min)	
S_3-Überstand (pH 6,95)		
$-F^-$	0,260	0,275
$+F^-$	0,260	0,350
S_3-Überstand (pH 8,2)		
$- F^-$	0,237	0,218
$+ F^-$	0,230	0,240

4.3.2.3. Auswirkung des Ernährungszustandes der Versuchstiere auf die PFK- Aktivierbarkeit durch Fluorid

Der in Tabelle 11 wiedergegebene Versuch verdeutlicht, daß der Entzug des Futters für nur 24 Stunden im Vergleich zum normalgefütterten Tier einen eindeutigen Einfluß auf die Aktivierbarkeit hervorruft. Die PFK des S_3-Überstandes von Lebern gehungerter Versuchstiere zeigt keinerlei Aktivierbarkeit durch Fluorid.

Tabelle 11: Auswirkung der Ernährungsbedingungen von Versuchstieren auf die Aktivierbarkeit der Leber-PFK durch NaF. Die S_3-Leberüberstände gefütterter und gehungerter Ratten werden, wie unter 4.2.1. beschrieben, hergestellt und anschließend mit und ohne Fluorid bei 25° C inkubiert. Aliquots der Inkubationsansätze werden nach der angegebenen Versuchsdauer zur Bestimmung der PFK entnommen (optimaler PFK-Test, s. Anhang, Methoden).

Inkubationsbedingung	PFK-Aktivität t = 0'	PFK-Aktivität t = 130'
	(ΔE_{366}/5 min)	
S_3 (gefüttert)		
- F^- (1 mM)	0,220	0,212
+ F^- (1 mM)	0,220	0,495
S_3 (24 Std.gehungert)		
- F^- (1 mM)	0,196	0,230
+ F^- (1 mM)	0,196	0,230
S_3(48 Std.gehungert)		
-F^- (1 mM)	0,220	0,245
+F^- (1 mM)	0,220	0,243
S_3 (72 Std.gehungert)		
-F^- (1 mM)	0,188	0,201
+F^- (1 mM)	0,198	0,239

4.3.2.4. Abhängigkeit der PFK-Aktivierung durch Fluorid von niedermolekularen Faktoren

Da schon nach 24 Stunden Hunger die PFK in dem Leberhomogenat dieser Tiere keine Aktivierbarkeit durch Fluorid aufweist, wird untersucht, ob in den S_3-Überständen vorkommende niedermolekulare Faktoren für die Aktivierung der PFK notwendig sind. Die Untersuchungen mit gelfiltrierten S_3-Überständen und Rekombinationen mit den Ultrafiltraten und ihre Ergebnisse gibt Tabelle 12 wieder.

Lfd. Nr.	Inkubationsbedingungen	PFK-Aktivität ($\Delta E_{366}/5'$) t = 0'	t = 150'	lfd. Nr.	Inkubationsbedingungen	PFK-Aktivität ($\Delta E_{366}/5'$) t = 0'	t = 150'
1.	S_3 (f)	0,204	0,125	11.	S_3(h)	0,196	0,145
2.	" + F^-	0,204	0,130	12.	" + F^-	0,196	0,143
3.	" + Ultrafiltrat (f)	0,206	0,205	13.	" + Ultrafiltrat (f)	0,216	0,210
4.	" + " + F^-	0,200	0,245	14.	" + " + F^-	0,216	0,195
5.	" + Ultrafiltrat (h)	0,200	0,190	15.	" + Ultrafiltrat (h)	0,216	0,195
6.	" + " + F^-	0,200	0,205	16.	" + " + F^-	0,216	0,185
7.	" + Ultrafiltrat (f) + ATP + F^-	0,206	0,335	17.	" + Ultrafiltrat (f) + ATP + F^-	0,216	0,297
8.	" + Ultrafiltrat (f) + G-6-P + F^-	0,206	0,278	18.	" + Ultrafiltrat (f) + G-6-P + F^-	0, 216	0,215
9.	" + Ultrafiltrat (h) + ATP + F^-	0,200	0,290	19.	" + Ultrafiltrat (h) + ATP + F^-	0,216	0,242
10.	" + Ultrafiltrat (h) + G-6-P + F^-	0,200	0,248	20.	" Ultrafiltrat (h) + G-6-P + F^-	0,216	0,190

Tabelle 12 : Untersuchungen zur Aktivierbarkeit der PFK durch Fluorid in Sephadex-G 25 filtrierten S_3-Überständen von Lebern normal gefütterter (S_3 (f)) und 48 Stunden gehungerter (S_3(h)) Ratten.
Die S_3-Überstände werden halbiert, ein Teil über Sephadex entsalzt, der andere Teil wird durch Ultrafiltration von hochmolekularen Proteinfraktionen abgetrennt. Die Rekombinationen werden im Verhältnis (1:2) mit und ohne Zusätze durchgeführt. Die Endkonzentrationen der Zusätze sind: F^- = 1 mM, G-6-P und ATP jeweils 0,5 mM. Die Inkubationen werden bei 25° C durchgeführt, nach der jeweiligen Versuchsdauer ein Teil zur PFK-Aktivitätsbestimmung entnommen (vgl.weitere Vers.Bed. 4.2.2.4.).

Die deutliche Steigerung des Aktivierungsphänomens durch die Zugabe von ATP bzw. G-6-P im Inkubationsansatz 7,8,9 und 10 und durch die ATP-Zugabe im Inkubationsansatz 17 (s.Tabelle 12), machen eine Prüfung erforderlich, ob ATP bzw.G-6-P das Ultrafiltrat als notwendiger Faktor in dem Aktivierungsvorgang ersetzen kann. Es zeigt sich, daß die Anwesenheit von G-6-P zum gelfiltrierten S_3-Überstand die gewöhnlich bei diesen Inkubationen auftretende Inaktivierung verhindert, daß Fluorid jedoch keine zusätzliche Aktivierung bewirkt. ATP allein bewirkt eine Aktivierung der gelfiltrierten S_3-Überstände um 11,3% (S_3(f)) bzw. um 20% (S_3(h)), während wiederum Fluorid keine weitere Steigerung der Aktivität bewirkt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13: Einfluß der Anwesenheit von ATP bzw. G-6-P auf die Aktivierbarkeit der PFK in gelfiltrierten S_3-Überständen aus Lebern mit Standardkost gefütterter und 48 Stunden gehungerter Ratten, in An- und Abwesenheit von F^-. Die ATP-, G-6-P- und F^--Endkonzentration ist jeweils 1 mM. Die Inkubationstemperatur beträgt 25°C.

Inkubationsbedingung	PFK-Aktivität t = 0'	PFK-Aktivität t = 150'
	(ΔE_{366}/5min)	
S_3(f)	0,230	0,173
S_3 + F^-	0,236	0,162
S_3 + ATP	0,230	0,260
S_3 + F^- + F^-	0,230	0,270
S_3 + G-6-P	0,230	0,225
S_3 + G-6-P + F^-	0,230	0,230
S_3 (h)	0,180	0,141
S_3 + F^-	0,183	0,140
S_3 + ATP	0,180	0,217
S_3 + ATP + F^-	0,182	0,213
S_3 + G-6-P	0,180	0,170
S_3 + G-6-P + F^-	0,180	0,190

Der in Tabelle 13 wiedergegebene Versuch veranschaulicht, daß deutlich zwischen einem Schutz vor Inaktivierung und einer echten Aktivierung der PFK im gelfiltrierten S_3-Überstand durch ATP und G-6-P unterschieden werden muß. Ohne Anwesenheit der durch Gelfiltration abgetrennten niedermolekularen Fraktionen bewirkt der Zusatz von G-6-P nur einen Schutz vor der sonst auftretenden Inaktivierung. ATP aktiviert die PFK in dem gelfiltrierten S_3-Überstand geringfügig (10-20%), doch diese Aktivierung ist durch Fluorid nicht beeinflußbar. Hieraus ist zu folgern, daß die in Tabelle 12 aufgezeigte Aktivitätssteigerung durch ATP um 40 bis 60% von der Anwesenheit niedermolekularer Faktoren in den Ultrafiltraten abhängig ist. Es ist zu beachten, daß auch G-6-P in Gegenwart von Ultrafiltraten eine echte Aktivitätssteigerung bewirken kann. Dieser ist jedoch nicht an der PFK in dem gelfiltrierten Leber-S_3-Überstand gehungerter Tiere zu sehen. Generell tritt der Fluorid-Aktivierungseffekt deutlich bei den Rekombinationsversuchen der Ultrafiltrate mit den gelfiltrierten S_3-Leberüberständen der gefütterten Versuchstiere hervor. Bei den gelfiltrierten S_3-Leberüberständen gefasteter Tiere ist nur ein schwacher Aktivierungseffekt zu beobachten.

4.3.2.5. Abhängigkeit der PFK-Aktivierung durch Fluorid von Proteinfaktoren

Eine Charakterisierung der für die PFK-Aktivierung durch NaF benötigten Proteinfraktionen wurde bisher nicht durchgeführt, doch gibt die Ammoniumsulfatfraktionierung der Proteine einen Hinweis darauf, daß eine aktivierende Proteinfraktion von der PFK abgetrennt werden kann. Die 33-40 %$(NH_4)_2SO_4$-Sedimentfraktion, die etwa 60% der gesamten PFK-Aktivität enthält, ist durch F^- auch in Gegenwart von 1 mM ATP durch 1 mM NaF nicht mehr aktivierbar. Erst bei Anwesenheit der 40-50%igem Ammoniumsulfatsediment-Fraktion wird eine deutliche Aktivierung der PFK sichtbar (vgl.Tab.14).

Tabelle 14: Aktivierbarkeit der Leber-PFK durch F^- nach fraktionierten Ammoniumsulfatfällungen. Der S_3-Überstand einer Rattenleber wird mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung fraktioniert. Die Sedimente werden jeweils in 2 ml Phosphat-Puffer aufgenommen und gegebenenfalls im gleichen Verhältnis miteinander, mit und ohne Zusätze, inkubiert. Die ATP-und NaF-Konzentration während der Inkubation beträgt jeweils 1 mM (vgl. weitere Versuchsbedingungen unter 4.2.3.).

Inkubationsbedingung	PFK-Aktivität		% der Ausgangsaktivität
	t = 0'	t = 120'	
	(ΔE_{366}/ 5 min)		
33-40% AS.-Fr. [1]	0,186	0,144	77,4
" + ATP	0,192	0,204	106,2
" $+F^-$ + ATP	0,190	0,200	105,3
33-40% AS.-Fr. + ATP + F + 0-25% AS.-Fr.	0,204	0,204	100,0
33-40% AS.-Fr. + ATP + F + 25-33% AS.-Fr.	0,238	0,306	128,6
33-40% AS.-Fr. + ATP + F + 40-50% AS.-Fr.	0,264	0,386	146,2
33-40% AS.-Fr. +ATP + F + 50-60% AS.-Fr.	0,206	0,240	116,5

[1] AS.-Fr. = Ammoniumsulfat-Sedimentfraktion

4.4. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über eine proteinabhängige Aktivierung der PFK

Fluorid und Phenylmethylsufonylfluorid bewirken eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der PFK im S_3-Überstand. Diese Aktivierung ist von mehreren Faktoren abhängig:

1. von der Anwesenheit von Phosphationen,
2. vom pH-Wert, mit einem Optimum bei pH 7,4 und einer totalen Unterdrückung bei pH 8,0,
3. von niedermolekularen Faktoren, die im S_3-Überstand der Lebern gefütterter Tiere zu finden ist,
4. von ATP,
5. von Protein-Faktoren, die nach einer Fraktionierung mit Ammoniumsulfats hauptsächlich zwischen einer 40-50-prozentigen Sättigung gefällt werden.

4.5. Diskussion

Die Ergebnisse der in Kapitel IV dargestellten Versuche sprechen auch bei vorsichtiger Interpretation für eine proteinabhängige Aktivierung bzw. Inaktivierung der PFK.
Da die Aktivierung absolut abhängig von der Anwesenheit von Fluorid, Phosphat-Ionen und ATP ist, neigen wir zu der Arbeitshypothese, daß bei diesem Ablauf eine Phosphatase und eine Kinase involviert sind. Hohe Konzentrationen an Phosphat und die Anwesenheit von Fluorid könnten möglicherweise die Phosphatase hemmen, während ATP für die Kinasereaktion benötigt würde.

Ein Vergleich zur Interkonvertierung der Pyruvat-Dehydrogenase drängt sich auf. Dieses Enzym wird durch eine ATP-abhängige Kinase-Reaktion inaktiviert (LINN et al.,1969). Die Reaktivierung erfolgt durch eine PDH-Phosphatase, die durch Mg^{2+} stimuliert wird (WIELAND und JAGOW-WESTERMANN,1969).
Der direkte Nachweis einer Aktivierung durch eine Phosphatase ist uns bisher nicht gelungen. Zwar ist im Homogenat eine Inaktivierung durch hohe Mg^{2+}-Konzentrationen (mehr als 10 mM) zu beobachten, doch ist dieser Effekt nicht aussagekräftig, da auch das gereinigte Enzym durch diese Mg^{2+}-Konzentrationen gehemmt wird. Da es uns bisher nicht gelungen ist, zwischen einer

direkten und einer möglichen indirekten Hemmung der PFK durch Mg^{2+} zu differenzieren, haben wir auf die Darstellung im Versuchsteil verzichtet. Für eine protein-katalysierte Interkonvertierung spricht ferner, daß der Reaktivierungsvorgang eine Kinetik zeigt, deren Maximum, je nach Bedingung, nach 60 - 90 Minuten erreicht ist. Keine Parallelität zur PDH-Phosphatase-kinase- oder Glykogen-Phosphorylase-b-Kinaseaktivierung ist in Bezug auf einen 3',5'-AMP-Effekt zu beobachten.

Die Effektivität der Protein- und niedermolekularen Faktoren im S_3-Überstand, die für den Aktivierungsvorgang der PFK notwendig sind, verändern sich in Abhängigkeit von dem Ernährungszustand. Der Konzentrationsanstieg oder -abfall dieser Effektoren während einer Hungerperiode macht eine Aktivierung unmöglich. Bei Rekombinationsversuchen mit gelfiltrierten Proteinfraktionen und den abgetrennten niedermolekularen Fraktionen von S_3-Überständen gefütterter und gehungerter Versuchstiere konnte gezeigt werden, daß sich sowohl die Proteinfraktionen als auch die niedermolekularen Fraktionen derart verändern, daß jeweils die Fraktionen von Lebern gefütterter Versuchstiere einen stärkeren Aktivierungseffekt hervorrufen (s.Tabelle 12). Während bereits eine Proteinabhängigkeit des Aktivierungsvorganges an der PFK gut belegt werden kann, bleibt die nähere Charakterisierung der Proteinfaktoren Aufgabe weiterer Forschungen.

Gesamtzusammenfassung

Das von uns durchgeführte Verfahren zur Reinigung der PFK aus Rattenleber führt zu einer zehntausendfachen Anreicherung des Enzyms und zur Abtrennung sämtlicher Fremdproteine. Es zeigt sich, daß das Enzym eine auffallende Tendenz hat, zu Molekulargewichten in Höhe von mehreren Millionen zu aggregieren. Das Monomer, für das wir ein Molekulargewicht in Höhe von 350.000 nachweisen können, läßt sich durch Behandlung mit SDS in identische Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 82.000 spalten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus mit Hilfe von Steady-State-Kinetiken und Produkthemmkinetiken befinden sich guter Übereinstimmung mit dem Modell eines geordneten sequentiellen Reaktionsmechanismus des Enzyms. Hiebei bindet F-6-P vor $MgATP^{2-}$ an der PFK, während als erstes Produkt $MgADP^{-}$, als zweites FDP vom Enzym abdissoziiert. Ein "rapid equilibrium" Mechanismus - wie für die PFK aus Muskelgewebe postuliert worden ist - kann für die PFK aus Rattenleber ausgeschlossen werden.

Von den auf ihren Einfluß auf die PFK-Regulation untersuchten Effektoren : ADP,ATP,F-6-P,NH_4^+ und Citrat, erscheint uns im Hinblick auf die in vivo Verhältnisse der Einfluß von F-6-P und ADP am bedeutsamsten zu sein. Geringfügige Schwankungen der ADP-Konzentrationen im physiologischen Bereich bewirken eine deutliche Zunahme der PFK-Aktivität, sofern das Enzym durch ATP gehemmt vorliegt. Letzteres ist auch bei den ATP-Konzentrationen in der Zelle anzunehmen.

Wir konnten schließlich eine proteinabhängige Zunahme der spezifischen PFK-Aktivität nachweisen. Die durch unsere Ergebnisse gestützte Annahme einer Phosphatase-Kinase-Reaktivierung bzw. Inaktivierung scheint uns - auch wenn die Charakterisierung der Faktoren bisher nicht gelungen ist - von heuristischer Bedeutung zu sein.

Anhang

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen 92

Enzymnomenklatur 92

Materialverzeichnis..... 93

Methoden..... 93
- Optischer PFK-Test 93
- Ermittlung kinetischer Konstanten ... 94
- PFK-Antikörperherstellung..... 95
- Reinigung von ADP 96
- Standard-Polyacrylamidgele 97

Verzeichnis der Abkürzungen

Aufgeführt werden Abkürzungen, die im Text nicht erklärt sind:

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
IgG	Immunoglobulin G
ITP	Inosintriphosphat
NAD, NADH	oxydiertes, reduziertes Nicotinamid-adenindinucleotid
NADP	oxydiertes Nicotinamiddinucleotidphosphat
Nitro-BT	Nitro-Blau-Tetrazolium, 3,3'-Dianisol-4,4'-bis-2(p nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
TEAE	Triäthylaminoäthyl-
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
EC No	Enzyme Commission Number

Enzymnomenklatur

Trivialname	systemat. Name	EC Nr.
Aldolase	Fructose-1,6-diphosphat D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lyase	4.1.2.13
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	D-Glucose-6-Phosphat: NADP Oxidoreductase	1.1.1.49
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat: NAD Oxidoreduktase	1.2.1.12
Glycerinphosphat-Dehydrogenase (GDH)	L-Glycerin-3-phosphat: NAD Oxidoreductase	1.1.1.8
Hexokinase	ATP: D-Hexose 6-phosphotransferase	2.7.1.1
Laktatdehydrogenase	L-Laktat: NAD Oxidoreductase	1.1.1.27
Phosphofructokinase	D-Fructose-6-phosphat 1-Phosphotransferase	2.7.1.11
Phosphoglucose-isomerase(PGI)	D-Glucose-6-phosphat Ketol-Isomerase	5.3.1.9
6-Phosphogluconat-Dehydorgenase(6-PGDH)	6-Phospho-D-gluconat: NADP Oxidoreductase	1.1.1.44
Pyruvatkinase (PK)	ATP: Pyruvat Phosphotransferase	2.7.1.40
Triosephosphatisomerase (TIM)	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat Ketol-Isomerase	5.3.1.1

Materialverzeichnis

Acrylamid	SCHUCHARDT, München
Ammoniumperoxydisulfat	FLUKA, Buchs/Schweiz
3-Dimethylaminopropionitril	FLUKA, Buchs/Schweiz
Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt
Coomassie Brillant Blue R-250	SERVA, Heidelberg
DEAE-Cellulose ,DE 52	WHATMAN
Dextran-Blue 2 ooo	PHARMACIA, Uppsala/Schweden
Nitro-BT	SIGMA, St. Louis/USA
Phenazinmethosulfat	SIGMA, St. Louis/USA
Sephadexe und Sepharose 4B	PHARMACIA, Uppsala/Schweden
Sucrose, p.A. zur Gradienten-zentrifugation	SERVA, Heidelberg
alle biochemischen Feinsubstanzen, soweit nicht speziell angeführt und	
alle Enzyme	BOEHRINGER, Mannheim
sonstige Substanzen und Lösungen mit p.a.-Reinheitsgrad	MERCK, Darmstadt

Methoden

Optischer PFK-Test

Die PFK-Aktivität wird mit folgendem optimalen Testansatz bestimmt, sofern im Text nicht andere Angaben vermerkt sind.

50 mM Triäthanolamin/HCl , pH 8,0
3 mM $MgCl_2$
5 mM Mercäptoäthanol
0,34mM NADH
2,4 mM AMP
2,4 mM F-6-P
0,6 mM ATP
0,72 U Aldolase, 0,72 U Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase und 10 U Triosephosphat-Isomerase

Die angegebenen Konzentrationen sind die Endkonzentraionen. Die Reaktion wird durch die Zugabe von ATP gestartet. Zur Bestimmung des Leerwertes wird der Test ohne ATP durchgeführt. Die Reaktionstemperatur beträgt 30°C, die Enzymmenge wird jeweils so gewählt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit ein ΔE von 0,05/min.nicht übersteigt.

Ermittlung kinetischer Konstanten aus Steady-State-Kinetiken

Nach CLELAND (1967) verlaufen die Reaktionen sequentieller (außer reinen "random") Mechanismen mit zwei Substraten so, daß sie folgender Gleichung entsprechen:

$$v = \frac{VAB}{K_{ia}K_b + K_bA + K_aB + AB} \qquad (1)$$

Bei doppelt reziproker graphischer Darstellung dieser Reaktionen ergeben sich Geraden, die folgender Gleichung entsprechen:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V}\left(1 + \frac{K_a}{A} + \frac{K_b}{B} + \frac{K_{ia}K_b}{AB}\right) \qquad (2)$$

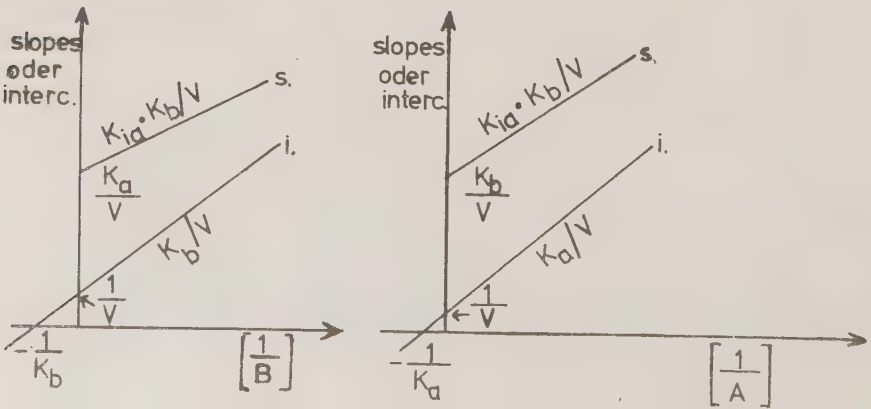
Da die Messungen der Steady-State-Kinetiken jeweils mit konstanten Konzentrationen des einen Substrates durchgeführt werden, formt man Gleichung (2) zweckmäßigerweise folgendermaßen um:

$$\text{(wenn B = konst.)}\quad \frac{1}{v} = \left(\frac{K_a}{V} + \frac{K_{ia}K_b}{VB}\right)\frac{1}{A} + \frac{1}{V} + \frac{K_b}{VB} \qquad (3)$$

oder

$$\text{(wenn A = konst.)}\quad \frac{1}{v} = \left(\frac{K_b}{V} + \frac{K_{ia}K_b}{VA}\right)\frac{1}{B} + \frac{1}{V} + \frac{K_a}{VA} \qquad (4)$$

Hierdurch wird deutlich, daß bei einer graphischen Auftragung von 1/v gegen 1/S aus den Steigungen und Schnittpunkten mit der Ordinate die kinetischen Konstanten ermittelt werden können. Hierzu werden die Steigungen und die Schnittpunkte mit der Ordinate gegen die reziproken Konzentrationen des fixen Substrates aufgetragen.



Zur Ermittlung der Hemmkonstanten der Produkthemmung geht man folgendermaßen vor:
Die Steigungen und Schnittpunkte mit der Ordinate der Geraden der doppelt reziproken Darstellung werden jeweils gegen die entsprechenden Produktkonzentrationen aufgetragen. Ergeben sich hierbei lineare Beziehungen, so entsprechen die Schnittpunkte dieser Geraden mit der Abszisse entweder $K_{i\ slope}$ oder $K_{i\ intercept}$.

PFK-Antikörperherstellung

Immunisierung: 1 mg PFK aus Rattenleber mit einer spezifischen Aktivität von 58 U/mg Protein ist für die Immunisierung eines Kaninchens benutzt worden. Das Protein, in 0,1 ml 20 mM K-PO_4-Puffer, pH 7,4, der 3mM $MgCl_2$ und 0,5 mM Dithiothreitol enthält, wird mit 0,1 ml FREUNDschem Adjuvant gemischt und dem Versuchstier injiziert (food pad); eine Nachimmunisierung mit 0,5 mgPFK erfolgt nach drei Wochen. Nach weiteren 6 Tagen wird der Antikörpertiter bestimmt. 40 ml Blut wird nach 15 Tagen vom Zeitpunkt der Nachimmunisierung an entnommen.

Serumgewinnung und Anreicherung der Immunglobulin G-Fraktion:
Das Vollblut, das dem Kaninchen mit Hilfe einer Saugglocke aus der Ohrvene entnommen wird, läßt man 30 Minuten stehen, löst die Oberfläche des Blutes von dem Zentrifugenglas und zentrifugiert dann 10 Minuten bei 2.000x g. Das Serum wird zur Anreicherung der Immunglobulin G (IgG)-Fraktion einer Caprylsäurefällung nach STEINBUCH und AUDRAN (1969) unterzogen.
18 ml Serum wird mit 36 ml Acetatpuffer 0,06 M, pH4,0 versetzt. Nach der Zugabe stellt man das pH mit 1 N Essigsäure auf 4,8 ein. Bei konstanter Temperatur von 20°C gibt man tropfenweise 1,22 g Caprylsäure zu, wobei die Lösung sehr schnell gerührt wird. Nach 30 Minuten weiterem Rühren zentrifugiert man 10 min. bei 8.000x g. Der Niederschlag wird resuspendiert in 0,015 M Acetatpuffer, pH 4,8 und wie oben erneut zentrifugiert. Dieser Überstand wird mit

dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt und 24 Stunden gegen 0,15 M NaCl dialysiert. Die Proteinfraktion wird dann mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpen-Vakuumapparatur in einer Ultrahülse (Nr.100 SCHLEICHER und SCHÜLL) auf das Ausgangsvolumen eingeengt. Aufbewahrt wird die IgG-Fraktion im Tiefkühlschrank bei $-17^{o}C$.

Der Nachweis des Antikörpers erfogt mittels der doppelten Immundiffusionstechnik nach OUCHTERLONY in der Modifikation nach CLAUSEN (1971,S .521 ff). Als Kontrolle benutzen wir ein Serum, das demselben Kaninchen vor der Erstimmunisierung entmommen und einer anschließenden Caprylsäurefällung wie oben unterzogen worden ist.

Reinigung von ADP

Zur Reinigung wurde die Methode von COHN (1957) variiert:
Auf eine Säule (1 x 13 cm),gefüllt mit Dowex,1 x 4 Cl^{-}-Form(SERVA) werden 500 mg ADP aufgetragen. Die Säule wird mit 50 ml H_2O nachgewaschen, dann eluiert man stufenweise mit 0,003 N HCl (100 ml) und 0,01 N HCL + 0,02 N NaCl (200 ml). Das Eluat wird auf Anwesenheit von AMP und ADP geprüft, die AMP-freien ADP-Fraktionen werden vereinigt, der pH auf 6,8 mit 0,1 N NaOH eingestellt und diese Lösung sofort eingefroren und bei $-17^{o}C$ aufbewahrt.Die Ausbeute ist 0,4 mMol reines ADP gewesen (ca.40%). Für die Produkthemmkinetiken haben wir gereinigtes ADP benutzt, das nicht länger als 3 Tage im Tiefkühlschrank gestanden hatte.

Metabolitbestimmungen

Die Metabolitbestimmungen sind sämtlich mit den in dem Handbuch Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg.BERGMEYER,1970) angegebenen Testansätzen durchgeführt worden.

Die Standard-Polyacrylamidgele werden zubereitet nach den von MAURER (1968) angegebenen Systemen I und IV . Die Modifikationen können dem Text jeweils entnommen werden.

Nr.	Gelsystem	Konzentrierung bei pH	Trennung bei pH	Trenngellösungen		
				Nr.	Best.-teile pro 100 ml	Misch-Verh.
I	pH 8,9-7,5% (Mittelpor-Gel)	8,3	9,5	1	1 N HCl 48,0 ml Tris 36,6 g TEMED 0,23 ml	1 T.1 2 T.2 1 T. H_2O
				2	Acrylamid 30 g BIS-" 0,8 g	4 T.3
				3	Per 0,14 g	
IV	pH 8,9 - 3,75%	8,3	9, 5	10	Acrylamid 15 g Bis „ 0,4g	1 T.1 2T.10 1T.6 4 T. H_2O

Elektroden pufferlösung : 5 g Tris , 28,8 g Glycin ad 1 000 ml H_2O. Zum Gebrauch wird eine 10%ige ,wässrige Lösung hergestellt.

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
BIS = N,N'-Methylenbisacrylamid
Per = Ammoniumperoxodisulfat

Die Daten der kinetischen Messungen werden nach der 'Methode der kleinsten Quadrate' ausgewertet.Die erhaltene Regressionsgerade stellt die beste Anpassung an die empirischen Werte dar. Berechnet wird die Regressionsgerade y = ax + b nach den Formeln:

$$a = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{N}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}} \qquad b = \frac{\sum y - a \sum x}{N}$$

(N = Anzahl der Meßwerte einer Meßwertreihe)

Literaturverzeichnis

AARONSON, R.P.,and C. FRIEDEN, Rabbit muscle phosphofructokinase: Studies on the polymerisation, J.Biol.Chem. 247(1972),7502-7509

ABRAHAMS, S.L.,and E.S. Younathan,Modulation of the kinetic properties of phosphofructokinase by ammonium ions, J.Biol.Chem. 246(1971),2464-2467

AFTING,E.-G.,RUPPERT,D.,HAGMAIER,V.,and H.Holzer, Yeast phosphofructokinase.Effector-controlled conversion of an ATP-sensitive to an ATP-desensitized form, Arch.Biochem.Biophys. 143(1971),587-592

AFTING,E.-G.,RUPPERT,D. and H.HOLZER, Yeast phosphofructokinase: Dependence of the ATP desensitization on effectors Arch.Biochem.Biophys. 152(1972),433-439

ATZPODIEN,W.,GANCEDO,J.M.,HAGMAIER,V. and H.HOLZER, Desensitization of yeast phosphofructokinase to ATP-inhibition by a protein fraction from yeast, Eur.J.Biochem. 12(1970),6-10

BACHELARD,H.S., CLARK,A.G., and M.F. THOMPSON, Cerebral-cortex hexokinase elucidation of reaction mechanisms by substrate and dead-end inhibitor kinetic analysis, Biochem.J. 123 (1971), 707-715

BERGMEYER, H.U. (Herausgeber) "Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, 2.Auflage, 1970

BEYTIA,E.,DORSEY,J.K,MARR,Jane, CLELAND,W.W., and J.P.Porter, Purification and mechanism of action of hog liver mevalonic kinase, J.Biol.Chem. 245 (1970),5450 - 58

BLANGY,D., BUC,H., and J.MONOD, kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from E.coli, J.Mol.Biol. 31 (1968),13 -35

Clark,G.C.,BLOXHAM,D.P., HOLLAND,P.C. and H.A.LARDY, Estimation of the fructose diphosphatase-phosphofructokinase substrate cycle in the flight muscle of BOMBUS AFFINIS, Biochem.J.134 (1973),589-597

CLAUSEN,J., Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Editors Work,T.S.,and E.Work) North Holland Publ.Comp. Amsterdam (1971)

CLELAND,W.W., The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products, Biochem.Biophys.Acta 67 (1963),109 - 137

CLELAND,W.W., Enzyme kinetics,
Annual review of biochemistry 36 (1967),77 - 112

CLELAND,W.W., Steady state kinetics
in: The enzymes, II, 1 - 65
3.Auflage (Editor: P.D.Boyer),Acad.Press,New York - London (1970)

COHN,W.E., Nucleic acid derivatives
in: Ion exchangers in organic and biochemistry
(Interscience Publ.,New York(1957)
(Editors: C.Calmon and T.R.E.Kressman

COTTAM,G.L.,and K.UYEDA, Manganese substrate complexes of phosphofructokinase studied by pulsed magnetic resonance,
Arch.Biochem.Biophys. 154 (1973), 683-690

GARCES, E., CLELAND,W.S., Kinetic studies of yeast nucleoside diphosphate kinase,
Biochemistry 8,633-640 (1969)

GARLAND,P.B.,P.J. RANDLE and E.A. NEWSHOLME, Phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, keton bodies, pyruvate, diabetes and starvation,
Nature 200 (1963), 169 - 170

GARRISON,J.C.,and R.C.HAYNES jr., Hormonal control of glycogenolysis and gluconeogenesis,
J.Biol.Chem. 248 (1973), 5333 - 5343

GRAYMORE,C., "Nothing"-dehydrogenase in the retina,
Nature 206 (1965), 1360 - 1361

GREENBAUM,A.L., GUMAA,K.A. and P.McLEAN, The distribution of hepatic metabolites and the control of the pathways of carbohydrate metabolism in animals of different dietary and hormonal status,
Arch.Biochem.Biophys. 143 (1971), 617 - 663

HOFER,H.W. und D.PETTE, Active und inaktive Formen der Phosphofruktokinase des Kaninchen-Skelettmuskels,
Hoppe-Sylers Z.Physiol.Chem. 349 (1968),1105-1114

HOFER,H.W., Influence of enzyme concentration on the kinetic behaviour of rabbit muscle phosphofructokinase,
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 352 (1971), 997-1004

HOFER, H.W. und D.PETTE, Wirkungen und Wechselwirkungen von Substraten und Effektoren an der Phosphofruktokinase des Kaninchen-Skelettmuskels,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349 (1968),1378-1392

HULME, E.C. ,and K.F. TIPTON , The isotope-exchange reactions of ox heart phosphofructokinase, Biochem.J. 122 (1971),181 - 187

KEE,A., and Ch.C.GRIFFIN, Kinetic studies of rabbit muscle phosphofructokinase, Arch.Biochem.Biophys. 149 (1972), 361 - 368

KEMP,R.G., Comparison of some properties with those of muscle phosphofructokinase., J.Biol.Chem. 246 (1971),245 - 252

KOPPERSCHLÄGER,G.,W.DIEZEL, B.BIERWAGEN und E. HOFMANN, Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines linearen Gelgradienten, FEBS Letters 5 (1969), 221-224

KOPPERSCHLÄGER,G., LORENZ, I., Diezel,W., MARQUARDT, J. und E. HOFMANN, Hefe-Phosphofruktokinase: Hydrodynamische Eigenschaften, Substruktur,Aminosäurezusammensetzung und Reaktivität der SH-Gruppen, Acta biol.med.germ. 29 (1972),561 - 580

KREBS,H.A., The Pasteur effect and the relation between respiration and fermentation, in: Essays in Biochemistry 8(1972), 1 - 34

LARDY,H.A. and R.E. PARKS jr., in: Enzymes units of biological structure and function, Academic Press Inc. New York, 1956 p.584 (Editor : O.H. Gaebler)

LAYZER, R.B., L.P. Rowland, and W.J.Bank, Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes, J.Biol.Chem. 244 (1969), 3823 - 3831

LEONARD, K.R.,andI.O. WALKER, Phosphofructokinase, Europ.J.Biochem. 26 (1972),442-448

LING,K.-H.,F.MARCUS, and H.A. LARDY, Purification and some properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase, J.Biol.Chem, 240 (1965), 1893 - 1899

LINN,T.C.,PETTIT, Flora H. and L.J. READ, α-Keto acid dehydrogenase complex X. Regulation of the activity of pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation, Proc.nat .Acad.Sci. 62 (1969), 234 - 241

LORENSON,M.Y., and T.E. MANSOUR, Studies on heart phosphofructokinase, binding properties of native enzyme and of enzyme desensitized to allosteric control, J.Biol.Chem. 244 (1969), 6420 - 6431

LOWRY, O.H., and J.V. PASSONEAU, Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase, J.Biol.Chem. 241 (1966),2268 - 2279

MANSOUR,T.E., N.WAKID and H.M. SPROUSE, Studies on heart phosphofructokinase: purification, crystallization and properties of sheep heart phosphofructokinase, J.Biol.Chem.241 (1969),1512

MANSOUR,T.E. und J.M.Mansour, Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine) and adenosine 3,5-phosphate on phosphofructokinase from the liver fluke, fasciola hepatica, J.Biol.Chem. 237 (1965), 629 - 634

MASSEY,Th.H. and W.C.Deal jr., Unusual, Metabolite-dependent solubility properties of phosphofructokinase, J.Biol.Chem.248 (1973), 56 - 62

MAURER, H.R., DISK-Elektrophorese: Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese, de Gruyter, Berlin (1968)

MORRISON, J.F., and Elizabeth JAMES, The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase, Biochem.J. 97 (1965), 37 - 52

MORRISON, J.F. and E.HEYDE, Enzymic phosphoryl group transfer, Ann.Rev.Biochem. 41 (1972),29 - 54

MOURAD, N. and PARKS,R.E. jr., Erythrocytic nucleoside diphosphokinase, II. Isolation and kinetics., J.Biol.Chem. 241 (1966), 271-278

NISSLER, K., Friedrich,S. und E. HOFMANN, Präparative Darstellung homogener Phosphofruktokinase aus Hefe, Acta biol.med.germ. 28 (1972), 739 - 749

PAETKAU,V. and H.A. LARDY, Phosphofructokinase:Correlation of physical and enzymatic properties, J.Biol.Chem. 242 (1967), 2035 - 2042

PAETKAU,V.H.,YOUNATHAN,E.S.,and H.A.LARDY, Phosphofructokinase: Studies on the subunit structure, J.Mol.Biol. 33 (1968),721-736

PARMEGGIANI, A. and BOWMANN,R.N. , Regulation of Phosphofructokinase activity by citrate in normal and diabetic muscle, Biochem.Biophys.Res.Commun. 12 (1963),268-273

PARMEGGIANI, A., J.LUFT, D.S. LOVE,and E.G.KREBS, Cristallisatiation and properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase, J.Biol.Chem. 241 (1966),4625 - 4637

PASSONNEAU,J.V., and O.H.LOWRY, Phosphofructokinase and the control of the citric acid cycle, Biochem.Biophys.Res.Comm. 13(1963), 372-379

POGSON,C.I., and P.J.RANDLE, The control of the rat-heart phosphofructokinase by citrate and other regulators, Biochem.J. 100(1966),683-693

RACKER,E. Mechanism of action and properties of pyridine nucleotide-linked enzymes, Physiol.Reviews 35(1955),1-56

RAMAIAH,A.,HATHAWAY,J.A., and D.E.ATKINSON, Adenylate as a metabolic regulator, J.Biol.Chem. 239(1964), 3619-3622

RAMAIAH,A.,and G.A.TEJWANI, Interconvertible forms of phosphofructokinase of rabbit liver, Biochem.Biophys.Res.Comm. 39(1970),1149-1156

RHOADS,D.G.,LOWENSTEIN,J.M., Initial velocity and equilibrium kinetics of myokinase, J.Biol.Chem. 243(1968), 3963-3972

ROSE,I.A.,and J.V.B. WARMS, Control of glycolysis in the human red blood cell, J.Biol.Chem. 241(1966),4848-4854

RUDOLPH,F.B., and H.J.FROMM, Use of isotope competition and alternative substrates for studying the kinetic mechanism of enzyme action, Biochemistry,9(1970), 4660-4665

SHAPIRO,A.L.,VINUELA,E., and MAIZEL,J.V.,Jr., Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamid gels, Biochem.Biophys.Res.Comm. 28(1967), 815-820

SLUSE,F.E.,and A.J.MEIJER,J.M.TAGER, Anion translocators in rat-heart mitochondria, FEBS LETTERS 18 (1971), 149 - 153

SÖLING,H.-D. und H.PETERS, in Vorbereitung,1973

SU,S.,and P.J. RUSSELL, Adenylate kinase from bakers' yeast III: Equilibrium exchange and mechanism J.Biol.Chem. 243 (1968), 3826-3833

STAAL,G.E.J.,KOSTER,J.F.,BÄNZIGER,C.J.M.,and L. v.MILLIGEN-BOERSMA, Human erythrocyte phosphofructokinase its purification and some properties, Biochim.Biophys.Acta 276 (1972), 113-123

START,C., and E.A.NEWSHOLME, The effects of starvation and alloxan-diabetis on the contents of citrate and other metabolic intermediates in rat liver, Biochem.J. 107(1968) ,411-415

STEGEMANN,H., Vertikale Plattenelektrophorese für mikroanalytische und präparative Trennungen in Gelen. Arbeitsvorschrift f. d. biochem.Praktikum in d. Agrikulturchemie ,Göttingen,WS 72/73

STEINBUCH,M., and AUDRAN,R., The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid, Arch.Biochem.Biophys. 134 (1969), 279-284

TANAKA,T.,AN,T., and Y.SAKANE, Studies on multimolecular forms of phosphofructokinase in rat tissues, J.Biochem. 69 (1971), 609-612

TAYLOR,C.B., and Margaret BEW, The distribution of two chromatographically distinguishable forms of phosphofructokinase in the tissues of the rat, Biochem.J. 119 (1970) ,797-799

TRIVEDI,B.,and W.H.DANFORTH, Effect of pH on the kinetics of frog mucle phosphofructokinase, J.Biol.Chem.241(1966), 4110-4112

UYEDA,K., Studies on the reaction mechanism of skeletal muscle phosphofructokinase, J.Biol.Chem. 245 (1970) ,2268-2275

VINUELA,E.,SALAS,M.L.,SALAS,M.,and SOLS,A., Two interconvertible forms of yeast phosphofructokinase with different sensitivity to endproduct inhibition, Biochem.Biophys.Res.Comm. 15(1964) ,243-249

WEBER,K.,and M.OSBORN, The reliability of molecular weight determinations of dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, J.Biol.Chem. 244(1969), 4406-4412

WIELAND,O.,and B.v.JAGOW-WESTERMANN, ATP-dependent inactivation of heart muscle pyruvate dehydrogenase and reactivation by Mg^{++}, FEBS LETTERS 3 (1969), 271-274

Lebenslauf

Am 24.12. 1941 wurde ich, Ingeborg Brand, als sechstes Kind des Kaufmanns Robert Brand und dessen Ehefrau Johanna, geb. Wentink in Deventer (Holland) geboren. 1944 siedelte meine Familie von Holland nach Deutschland, Westfalen, über. In Brackwede bei Bielefeld besuchte ich die Volks- und Realschule, in Bielefeld anschließend die Oberschule bis zum Abitur im Jahre 1963. Im Frühjahr d.J. begann ich in Tübingen mit dem Studium der Biochemie, das mit der schriftlichen Diplomarbeit zum Thema Glutathion-Peroxidase-Bestimmungsmethoden im Frühjahr 1969 abgeschlossen wurde.

Seit April 1969 bin ich in der Abteilung für Klinische Biochemie (Leiter Prof.Dr.H.D.SÖLING) der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen tätig. Mein Hauptarbeitsgebiet ist seither die Erforschung des glykolytischen Enzyms Phosphofruktokinase aus Rattenleber. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden zum Teil in meiner Dissertation vorgelegt.